

TETANUSTOKSOIDIN ULTRASUODATUSKOKKEITA

Diplomityö, jonka
Seppo Tapani Ihalainen
on jättänyt tarkastettavaksi
TEKNILLISEN KORKEAKOULUN
kemian osastossa
diplomi-insinöörin tutkintoa varten

Otaniemessä, kesäkuun 10. päivänä 1976

Tekijän nimikirjoitus: *Tapani Ihalainen*.....

Työn johtajan
nimikirjoitus:

Peli Kauppinen
.....

Diplomityön kokeellinen osa on tehty Teknillisen Korkeakoulun biokemian ja elintarviketeknologian laboratoriossa 1975-03-15 ... 1975-09-15.

Kiitän erityisesti Prof. Veli Kauppista työni ohjauksesta. Samalla kiitän myös muita biokemian ja elintarviketeknologian laboratoriossa työskenteleviä saamistani neuvoista ja käytännön avusta työni aikana. Edelleen kiitän kemian osaston työpajojen henkilökuntaa saamistani käytännön avusta laitteiston rakentamisessa.

Tahdon kiittää myöskin Fil. lis. Tapani Kurosta Kansanterveyslaboratorion Keskuslaboratoriosta saamistani materiaalista ja kirjallisuudesta sekä lukuisista neuvoista. Samoin kiitän muuta rokoteosaston henkilökuntaa, jolta sain apua tutustuessani työni aihepiiriin.

SISÄLLYSLUETTELO

JOHDANTO	6
----------------	---

KIRJALLISUUSOSA

1. Immunitaetti	7
2. Rokotteet	8
2.1. Virusrokotteet	8
2.1.1. Virusrokotteiden valmistuksesta	9
2.2. Bakteerirokotteet	9
2.3. Rokotukset Suomessa	11
3. Jäykkäkouristus ja jäykkäkouristusrokote	12
3.1. Jäykkäkouristus eli tetanus	12
3.2. Tetanustoksiini	12
3.3. Tetanustoksoidi	14
3.4. Yksiköt	15
3.5. Jäykkäkouristusrokotteen historiaa	16
3.6. Tetanustoksoidin valmistus	17
3.7. Tetanustoksoidin puhdistus	20
3.8. Rokotteen valmistus	21
4. Ultrasuodatus	22
4.1. Yleistä	22
4.2. Ultrasuodatuksen peruskäsitteitä	26

4.3. Ultrasuodatuskalvot	29
4.4. Konsentraatiopolarisaatio	32
4.5. Ultrasuodatuslaitteistot	36
4.6. Kasvatusliuosten konsentrointi ultrasuodatuksella	38
4.6.1. Olosuhteiden vaikutus permeaattivuohon	38

KOKEELLINEN OSA

5. Materiaalit	42
5.1. Tetanustoksoidi	42
5.2. Ultrasuodatuskalvot	42
6. Laitteisto	43
6.1. Koejärjestelyt ja kokeiden suoritus	45
7. Analyysimenetelmät	49
7.1. Proteiinin määrittäminen	49
7.2. Typpimäärittäminen mikro-Kjeldahl-menetelmällä .	50
7.3. Toksoidin määrittäminen sakkautusreaktiolla	53
8. Kokeet omatekoisilla ultrasuodatuskalvoilla	54
8.1. Esikokeet	54
8.2. Konsentroidintikokeet	58
8.2.1. Konsentroidintikokeet selluloosa-asettaatti- kalvolla CA-50	58

8.2.2. Konsentrinti selluloosa-asettaatti- kalvolla CA-40	60
8.2.3. Konsentrinti selluloosa-asettaatti- kalvolla CA-35	61
8.3. Mittakaavan laajentaminen	62
8.4. Kalvojen pesun vaikutus	63
9. Tulosten tarkastelu	64
YHTEENVETO	69
KIRJALLISUUS	70
Liitteet 1...5	

JOHDANTO

Bakteerirokotteista muodostavat toksoidirokotteet oman ryhmänsä. Toksoidi on vaarattomaksi tehtyä toksiinia. Suomessa valmistetaan toksoidirokotteita kurkkumätää ja jäykkäkouristusta vastaan. Valmistus tapahtuu Kansanterveyslaboratorion Keskuslaboratoriossa. Raakatoksoidiliuokset konsentroidaan ultrasuodattamalla, suodatuskalvomaateriaalina on selluloosanitraatti eli kollodium. Konsentroitivaihe on hidas, ja sen aikana toksoidi on alttiina mahdolliselle kontaminaatiolle.

Walliander et al. (30) on tutkinut entsyymien konsentroitua ultrasuodatuksella. Tutkimuksessa omatekoiset selluloosa-asettaattikalvot osoittautuivat sopiviksi entsyymien konsentroinnissa. Tämän diplomityön tarkoituksena oli selvittää, soveltuuko omatekoinen selluloosa-asettaattikalvo tetanustoksoidin konsentroitintaan. Suurimpana vaikeutena on toksoidin molekyylikoon suuri vaihtelu, minkä johdosta ultrasuodatuskalvo tukkeutuu nopeasti.

KIRJALLISUUSOSA

1. IMMUNITEETTI

Kun vieraita aineita, tavallisesti joitakin mikro-organismeja, joutuu elimistöön, niille alkaa muodostua vasta-aineita, jotka tekevät ne vaarattomiksi. Tätä elimistön itsensä aikaansaamaa immuniteettia nimitetään aktiiviseksi immuniteetiksi. Se on tavallisesti täydellinen ja pitkäaikainen. Ns. luonnollinen aktiivinen immuniteetti syntyy, kun eläin tai ihminen sairastuu johonkin infektio-tautiin ja paranee siitä. Keinotekoinen aktiivinen immuniteetti saadaan aikaan ruiskuttamalla elimistöön rokotetta, joka aiheuttaa vasta-aineen muodostumisen. Saavutettu suoja on usein monivuotinen, mutta suojan vahvistamiseksi tarvitaan tehostusannoksia.(1)

Passiivinen immuniteetti tarkoittaa etukäteen muodostuneiden vasta-aineiden vastaanottoa. Tällöin vasta-aine muodostuu toisessa organismismissa aktiivisen immuniteetin kautta ja siirtyy sitten uuteen organismiin. Vaikutus alkaa välittömästi, mutta vasta-aineet säilyvät elimistössä vain muutamasta viikosta puoleen vuoteen, koska ne ovat elimistölle vieraita proteiineja. Myös passiivisessa immuniteetissa voidaan erottaa luonnollinen ja keinotekoinen immuniteetti. Luonnollista passiivista immuniteettia on suoja, jonka vastasyntynyt on saanut äidil-

tään istukan kautta ja äidinmaidosta. Keinotekoinen passiivinen immunitetti saadaan aikaan ruiskuttamalla elimistöön toisessa organismissa muodostuneita vasta-aineita. Menetelmää käytetään toisinaan, kun immunisoimaton elimistö joutuu infektion kohteeksi.(1)

2. ROKOTTEET

Rokotteita käytetään elimistön aktiiviseen immunisointiin tarttuvia tauteja vastaan. Rokotteet jaetaan virusrokotteisiin ja bakteerirokotteisiin.

2.1. Virusrokotteet

Virusrokotteet voidaan jakaa eläviin rokotteisiin ja inaktivoituihin rokotteisiin.(2) Elävät virusrokotteet ovat yleisempiä. Niitä on saatavana mm. isorokkoa, poliota, keltakuumetta, vihurirokkoa, tuhkarokkoa, lasten sikotautia ja influenssaa vastaan. Inaktivoituja virusrokotteita ovat mm. Suomen armeijassa käytössä oleva sikotautirokote, vesikauhurokote sekä Salk-tyyppinen poliorokote, jota käytetään vain Suomessa, Ruotsissa ja Hollannissa.

2.1.1. Virusrokotteiden valmistuksesta

Virusrokotteita valmistettaessa täytyy käyttää eläviä kasvualustoja, koska virukset pystyvät lisääntymään vain elävän solun sisällä.

Käytössä on seuraavanlaisia kasvualustoja (3 s.406):

1. Eristetyt kudosisviljelmät ovat viljelmiä, joissa erilaisista kudoksista eristettyjä soluja viljellään keino-tekoisella kasvualustalla, ja rokoteviruksia kasvatetaan näissä soluissa. Soluviljelmissä kasvatetaan mm. polio-, isorokko-, tuhkarokko-, vihurirokko- ja vesikauhurokoteviruksia.
2. Kanan ja ankan alkiot, jolloin rokoteviruksia viljellään hautomakoneeseen sijoitetuissa hedelmöitettyissä munissa, tarkemmin sanoen alkion joko allantois- tai amnionontelossa. Tällä tavoin tuotetaan mm. keltakuume-, isorokko-, influenssa-, sikotauti- ja vesikauhurokotteita.
3. Elävän vasikan tai lampaan ihokudos on vanhin rokoteviruksen viljelyalusta. Sitä käytetään vieläkin isorokkorokotteen valmistuksessa.

2.2. Bakteerirokotteet

Bakteerirokotteet voidaan jakaa neljään päätyyppiin (3 s.675):

1. Tapetuista bakteerisoluista valmistetut rokotteet.
Sellaisia ovat hinkuyskä-, lavantauti-, pikkulavantauti-, rutto- ja kolerarokotteet.
2. Elävistä heikennetyistä bakteerisoluista valmistetut rokotteet, esim. tuberkuloosirokote.
3. Bakteerisolun eristetyistä komponenteista valmistetut rokotteet. Tällaisia on valmistettu mm. hinkuyskää, lavantautia, pikkulavantautia sekä aivokalvontulehdusta vastaan. Ne ovat vielä suureksi osaksi kokeiluasteella.
4. Toksoidirokotteet. Toksoidirokotteita on olemassa mm. kurkkumätää, jäykkäkouristusta, botulismia ja stafylokokkitauteja vastaan, mutta näistä vain kahdella ensin mainitulla on suurempaa käytännöllistä merkitystä.

Taulukko I (3 s.679)

Yleisesti käytettävien bakteerirokotteiden koostumus ja suojausteho.			
TAUTI	Rokotteen koostumus	Suojausteho	Perusrokotuksen antaman suojan kesto
HINKUYSKÄ	Formaliinilla tai lämmöllä tapettuja Bordetella pertussis -bakteereja max. 20×10^9 /annos WHO:n suositttelema immunisointiteho min. 4 IIU/annos	~ 85 %	1 v
JÄYKKÄKOURISTUS	Puhdistettua tetanustoksoidia 5 Lf/annos, aluminiumgeeliin absorboituna	~ 100 %	5 v
KOLERA	Formaliinilla tapettuja Vibrio cholerae Ogawa ja Inaba-kantoja min. 8×10^9 /annos	50 %	6 kk
KURKKUMÄTÄ	Puhdistettua difteriatoksoidia 15 Lf/annos aluminiumgeeliin adsorboituna	> 90 %	5 v
LAVANTAUTI	Lämpö-fenoli- tai asetonikäsittelyllä tapettuja Salmonella typhi -bakteereja min. 10^9 /annos	70-90 %	1 v
RUTTO	Tapettuja Pasteurella pestis -bakteereja 3×10^9 /ml	»hyvä»	6 kk
TUBERKULOOSI	Kylmäkuivattuja, eläviä, heikennettyjä BCG-soluja $3-5 \times 10^6/0.1$ ml rokotetta	~ 80 %	10 v

2.3. Rokotukset Suomessa

Yleisiä rokotuksia suoritetaan lastenneuvoloissa ja kouluissa sekä asevelvollisille puolustusvoimissa. Vuonna 1975 oli rokotusohjelma taulukon II mukainen (4).

Taulukko II Rokotusohjelma Suomessa vuonna 1975 (4)

Neuvola- ja koulurokotukset	
0 - 1 viikko	Calmette (BCG)
2 - 3 kk	Kolmoisrokote I (hinkuyskä, kurkkumätä ja jäykkäkouristus)
3 - 4 kk	Kolmoisrokote II
4 - 5 kk	Kolmoisrokote III
5 - 6 kk	Polio I
6 - 7 kk	Polio II
12 kk	Tuhkarokko
18-24 kk	Isorokko Polio- ja kolmoisrokotetehosteet
6 - 7 vuotta	Polio-, kurkkumätä- ja jäykkäkouristustehosteet
9-10 vuotta	Isorokko - uusinta
11-13 vuotta	BCG - uusinta tarvittaessa
13 v. tytöt	Vihurirokko
14-16 vuotta	Polio - uusinta
16-18 vuotta	Jäykkäkouristustehoste
Puolustusvoimissa annettavat rokotukset	
Isorokko, polio, jäykkäkouristus, sikotauti ja aivokalvontulehdus	
Lisäksi suositellaan polio-uusinta viiden vuoden väliajoin ja jäykkäkouristus-uusinta kymmenen vuoden väliajoin. Vastasynnyttäneille äideille tarjotaan vihurirokkorokotusta synnytyssairaaloissa.	

3. JÄYKKÄKOURISTUS JA JÄYKKÄKOURISTUSROKOTE

3.1. Jäykkäkouristus eli tetanus (5)

Jäykkäkouristus ei varsinaisesti ole tarttuva tauti. Ihminen saa jäykkäkouristuksen aina jonkin loukkaantumisen yhteydessä. Jäykkäkouristuksen aiheuttaja Clostridium tetani on anaerobinen itiöllinen suolistobakteeri ja sitä joutuu eräiden eläinten, esim. hevosen, ulosteiden mukana maahan. Itiöt säilyvät maassa elävinä hyvin pitkää aikoja. Kun itiöpitoista maata joutuu haavaan, muuttuvat itiöt vegetatiivisiksi soluiksi ja alkavat lisääntyä. Samalla muodostuu tavattoman voimakasta myrkkyä, tetanustoksiinia, joka aiheuttaa varsinaisen taudinkuvan, jäykkäkouristuksen. Taudin itämisaika on 1 - 2 viikkoa, joten haava on jo saattanut parantua taudin puhjetessa. Sairaus johtaa useimmiten kuolemaan, kuolleisuus on koko maailmassa 40...78 % (6 s.104). Tauti on täysin ehkäistävissä aktiivisella immunisoinnilla tetanustoksiinia vastaan. Luonnollinen tetanussairaus ei tuota immuni-teettia, koska annos, joka riittää tappamaan, on vielä liian pieni aiheuttaakseen riittävän vasta-aineen muodostumisen.

3.2. Tetanustoksiini

Tetanustoksiini on proteiini, joka sisältää 15,7 % typpeä,

0,065% fosforia ja 1,04% rikkiä. Se ei sisällä hiilihydraatteja eikä lipidejä. Todennäköisin molekyylipaino on n. 66 000 (6 s.82).

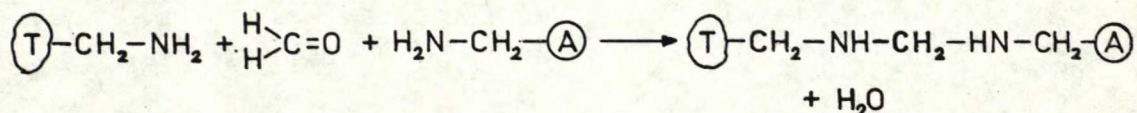
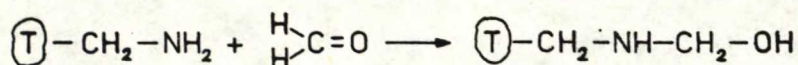
Tetanustoksiini on yksi kolmesta voimakkaimmasta tunnetusta biologisesta myrkystä, muut ovat botuliinitoksiini ja dysenteriatoksiini (7). Tetanustoksiini on niin voimakasta, että 1 ml liuosta, joka on tehty liuottamalla 1 mg toksiinia puoleen miljoonaan litraan vettä, aiheuttaa hiiressä halvauksen. (10^{-5} mg toksiinia tappaa ihmisen.)

Bakteerin toksiinintuotannon fysiologia on vielä tuntematon. Bakteeri ei näytä mitenkään hyötyvän toksiinista: se ei tuhoa mitään kudoksia, niin että se helpottaisi bakteerin pääsyä niihin. Toksiinin vaikutus näyttää rajoittuvan hermokudokseen, jonka kanssa bakteeri kuitenkin hyvin epätodennäköisesti joutuu kosketuksiin infektion aikana. Toisaalta on tuskin uskottavaa, että bakteeri tuottaa proteiinin kaltaista monimutkaista ainetta 5...10% omasta painostaan ilman, että sillä on mitään merkitystä organismille. (6 s.82)

Myrkky kulkeutuu vahingoittuneesta kudoksesta hermoja pitkin selkäytimen etusarven soluihin, jotka ärtyvät aiheuttaen tetanukselle ominaiset lihaskouristukset.

3.3. Tetanustoksoidi

Tetanustoksoidi on formaldehydin avulla myrkyttömäksi tehtyä tetanustoksiinia. Toksoidisoitumisreaktiossa formaldehydi muodostaa metyleeni ($-\text{CH}_2-$) -siltoja toksiinimolekyylin amino-, amidi-, guanidyyli-, fenoli-, imidatsoli- ja indoliryhmien välille. (3 s.678) Siltoja muodostuu myös kahden tai useamman toksiinimolekyylin välille tai toksiinimolekyylin ja vapaiden aminohappojen välille, jos niitä on läsnä:



$\textcircled{\text{T}}$ on toksiinimolekyyli, vapaa aminoryhmä näkyvissä

$\textcircled{\text{A}}$ on aminohappomolekyyli, vapaa aminoryhmä näkyvissä

Kun toksoidisointi suoritetaan Cl. tetanin kasvatusliuoksessa, ns. raakatoksoidiliuoksessa, on läsnä aina vapaita aminohappoja, joiden kanssa formaldehydi reagoi. Jos toksiini on erotettu raakatoksoidiliuoksesta, ja toksoidisointi suoritetaan liuoksessa, jossa vapaita aminohappoja ei ole, saadaan labiili tuote, joka saattaa palautua takaisin toksiiniksi. Kun toksoidisointi suoritetaan puhdistetulla toksiinilla, lisätään tämän vuoksi joukkoon joitakin aminohappoja kuten lysiiniä, jolloin saadaan pysyvä tuote. (5)

3.4. Yksiköt

Toksiinin ja toksoidin määriä ilmoitettaessa käytetään useita eri yksiköitä:

- Dlm (Dosis lethalis minimum) ilmoittaa pienimmän annoksen toksiinia, joka tappaa määräpainoisen koe-eläimen (hiiren tai marsun) (3).
- Lf- (Limes flocculation) yksikköä määritettäessä tarvitaan standardoitua antitoksiinia, joka muodostaa saostuman toksiinin ja toksoidin kanssa. Yksi Lf-yksikkö toksiinia tai toksoidia on ekvivalentti yhden antitoksiiniyksikön kanssa. Saostuma syntyy selvimmin ja nopeimmin, kun toksiinia tai toksoidia sekä antitoksiinia on ekvivalentit määrät. Lf-yksikkömäärä mitataan lisäämällä sarjaan koeputkia tietty määrä toksiinia tai toksoidia sekä nouseva määrä antitoksiinia. Putkia inkuboidessa 56°C havaitaan, että yhteen putkeen ilmestyy valkea hiutalemainen saostuma aikaisemmin kuin muihin. Kun antitoksiinin määrä on tunnettu, voidaan toksiinin Lf-yksikkömäärä laskea. Antitoksiiniyksikkö perustuu WHO:n säilömään kansainväliseen antitoksiinistandardiin. (3, 8)
- L₊-annos tarkoittaa sellaista toksiinimäärää, joka sekoitettuna yhden antitoksiiniyksikön kanssa tappaa koe-eläimen (5).
- LD₅₀ on tilastollisesti laskettu annos, joka pystyy tappamaan puolet käsitellyistä koe-eläimistä (9).

Toksiinin ja toksoidin puhtauden mittana käytetään Lf-yksikkömäärää per mg proteiinityyppeä (Lf/mg prot. N).

3.5. Jäykkäkouristusrokotteen historiaa

Kuten edellä mainittiin, tetanustoksiinin aiheuttamaa luonnollista immuniteettia ei ole tavattu. Ensimmäisestä keinotekoisesta eläimen immunisoinnista tetanusta vastaan ilmoittivat von Behring ja Kitasato v. 1890. Immunisointikeinosta ei ole varmuutta. (6, s. 103) Vuonna 1909 Löwenstein keksi, miten Toksiini voidaan muuttaa toksoidiksi formaldehydin avulla. Toksiinimolekyylissä tapahtuneet muutokset ovat siksi vähäisiä, että vasta-aine, jonka muodostumisen toksoidi saa aikaan, neutraloi myös Toksiinin. Tällä vasta-aineella, tetanusantitoksiinilla, voidaan eläin ja ihminen suojata passiivisesti jäykkäkouristusta vastaan, mutta sen antama suoja ei ole pitkäaikainen. Tetanustoksoidilla suoritettu aktiivinen immunisointi tuottaa kestävän suojan. (5)

Ensimmäisen maailmansodan aikana oli saksalaisilla käytössään von Behringin kehittämä passiivinen immunisointi tetanusta vastaan. Haavoittuneille annettiin immunisointujen hevosten veriseerumia. Tätä suojauskeinoa käytettiin toiseen maailmansotaan saakka. Anglosaksissa maisa oli sillä aikaa kehitetty aktiivinen immunisointi tetanustoksoidilla, mistä oli se etu, että miehet voitiin

rokottaa etukäteen. Sodan jälkeen alettiin tetanusrokotetta käyttää myös siviileille.(5)

3.6. Tetanustoksoidin valmistus

WHO on laatinut suositukset, jotka on otettava huomioon jäykkäkouristusrokotetta valmistettaessa (10). Ohjeet koskevat tetanustoksoidin valmistusta, tuotantokontrollia, pakkaamista ja lopullista tarkastusta. Käytettävän Cl. tetani-kannan on tuotettava mahdollisimman paljon toksiiinia. Elatusaine, joka myös vaikuttaa toksiiinin tuotantoon, ei saa sisältää mitään aineksia, jotka voivat aiheuttaa toksisia tai allergisia reaktioita ihmisessä. Tämä sen tähden, että lopullinen rokote sisältää usein joitakin elatusaineen komponentteja, joista ei ole puhdistuksessa päästy eroon.

Toksiinin ja toksoidin tuotannossa voidaan käyttää eri menetelmiä. Tavallisesti viljelmän annetaan kasvaa 4...5 vuorokautta kunnes organismi autolysoituu ja toksiiini vapautuu liuokseen (6 s. 76). Solujen poiston jälkeen toksiiini voidaan saostaa pois ja puhdistaa edelleen ennen toksoidisointia. Toinen mahdollisuus on lisätä formaldehydiä suoraan kasvatusliuokseen ja puhdistaa toksoidi saostamalla ja kromatografisin menetelmin. Jälkimmäisessä menetelmässä välttytään puhtaan toksiiinin käsittelyn

vaaroilta, toisaalta puhdasta toksiinia on huomattavasti helpompi esim. konsentroida sen tasaisen molekyylikoon vuoksi. Raynaud (11) kehitti menetelmän toksiinin erottamiseksi ennen solujen autolyysiä. Tällä tavalla saadaan toksiini talteen hyvin puhtaana: solut yksinkertaisesti sentrifugoidaan eroon kasvuliuksesta ja pestään, minkä jälkeen toksiini voidaan erottaa uuttamalla.

Suomessa jäykkäkouristusrokotetta valmistetaan Kansanterveyslaboratorion keskuslaboratoriossa. Myös Orion Oy valmistaa rokotetta, mutta saa tarvitsemansa raaka-aineen toksoidina em. paikasta.

Kansanterveyslaboratorion keskuslaboratorion käyttämä C1. tetani-kanta on ns. Massachusetts-kanta, jota säilytetään lyofiloituna, jotta sen ominaisuudet eivät pääsisi muuttumaan. Elatusaineena on haimalla hydrolysoituun kaseiiniin (12) perustuva ns. Mueller-Miller-alusta (13) (liite 4 ja 5).

Kasvatus aloitetaan siirrostaamalla lyofiloitua laktoosigelatiinissa olevaa bakteerisuspensiota viiteen lihalie-mikoeputkeen (liite 4:A), jotka tarvitaan yhtä 100...120 l panosta varten (liite 1). Putkia inkuboidaan vuorokausi 35°C anaerobisesti, jonka jälkeen niistä otetaan näyte veriagarille. Kunkin putken sisältö tyhjennetään 1 l ympipulloon, jossa on 800 ml kasvuliusta sekä 1,35 g rau-

tajauhetta. Pulloja inkuboidaan jälleen vuorokausi 35°C anaerobisesti, ja näytteet otetaan jokaisesta pullosta veriagareille, joita inkuboidaan sekä aerobisesti että anaerobisesti mahdollisten kontaminaatioiden paljastamiseksi.

Varsinainen kasvatus tapahtuu syväviljelynä 3 l Roux-pulloissa, joissa on kasvuliuosta 2200 ml sekä 0,5 g rautajauhetta. Pulloihin lisätään noin 50 ml ymppeä ja ne suljetaan vanutupolla sekä alumiinihylsillä.

Pulloja pidetään 35°C 4 vuorokautta, minkä jälkeen niistä otetaan näytteet, kuten edellä. Vuorokauden kuluttua näytteistä nähdään, onko kontaminaatiota tapahtunut. Kontaminoituneet pullot hylätään ja muiden pullojen sisältö yhdistetään 10 l pulloihin. Tämän jälkeen otetaan näytteet määrityksiä ja kontrolleja varten. Bakteerikasvuston laatu tutkitaan Gram-värjäyksen avulla, toksiinin määrä mitataan Lf-määrityksen sekä eläinkokein suoritettavilla L₊- ja Dlm-määrityksillä.

Vuorokauden kuluttua lisätään kuhunkin hyväksyttyyn pulloon 0,165 % formaldehydiä. Tämän jälkeen pullot saavat olla kolme vuorokautta 35°C, ja niitä ravistellaan kerran vuorokaudessa. Formaldehydi tappaa bakteerit, ja toksoidisoitumisreaktio lähtee käyntiin. Seuraavaksi pullot siirretään huoneenlämpöön ja niistä otetaan näyte HST-lihaliemeen (ditiioniittitioglykolaatti-lihal.), jolloin saadaan

selville ovatko kaikki solut kuolleet.

Kun solujen kuolema on varmistettu kolmen vuorokauden kulluttua, ne suodatetaan pois kasvuliuoksesta piimaan avulla. Sen jälkeen liuos suodatetaan steriiliksi asbestisuotimilla. Tässä vaiheessa liuos on vielä toksista. Liuos saa seistä 10 l pulloissa neljä viikkoa 35°C toksoidisoitumassa. Tämän jälkeen tästä ns. raakatoksoidista määritetään formaldehydipitoisuus sekä Lf-yksikkömäärä, lisäksi otetaan ns. steriilikontrollinäyte HST-lihalieemeen. Toksoidisoitumisen täydellisyys varmistetaan antamalla joukolle marsuja 5 ml toksoidiruiske ja seuraamalla niiden vointia kuuden viikon ajan. Tämän ajan raakatoksoidipullot pidetään $+4^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa. Toksoidikonsentraatio on tässä vaiheessa noin 35 Lf/ml.

3.7. Tetanustoksoidin puhdistus

Raakatoksoidi konsentroidaan aluksi noin 15-kertaiseksi, jolloin saadaan saostamiselle sopiva konsentraatio (500 Lf/ml) (14). Konsentroidi suoritetaan ultrasuodatuksella. Laitteistona on kuusi bakteerisuodatuskynttilää, joiden päälle on valettu kollodiumkalvo. Kynttilät on upotettukonsentroitavaan raakatoksoidiliuokseen, ja suodos imetään kalvon läpi. Suodokseen tulee myös pienimolekyylisiä epäpuhtauksia ja suoloja sekä formaldehydiä. Pesemällä konsentraattia lopuksi suurella vesimäärällä

saadaan poistetuksi lähes kaikki dialysoituvat epäpuhtaudet, mm. väriaineet. (5) Kollodiumkalvolla suodatus kestää noin viikon 100 l panosta kohden.

Seuraava puhdistusvaihe on fraktioiva kaliumfosfaattisaostus (K_2HPO_4) (14). (Liite 2) Ensimmäisessä vaiheessa liuos tehdään 0,85 M:ksi kaliumfosfaatin suhteen. Tällöin saostuu epäpuhtauksia, ja toksoidi jää liuokseen. Toisessa vaiheessa liuos tehdään 1,2 M:ksi kaliumfosfaatin suhteen, jolloin toksoidi saostuu. Sakka liuotetaan mahdollisimman pieneen vesimäärään, ja liuoksen pH korjataan 7:ksi. Mikäli tarpeellista, liuos konsentroidaan vielä pienellä ultrasuodatuslaitteella. Suolat ja loput epäpuhtaudet poistetaan geelisuodatuksella. Saadusta toksoidifraktiosta, joka on ensin konsentroitunut, määritetään tyyppi, Lf-arvo sekä eläinkokein sen immunisoiva teho ja haitattomuus.

3.8. Rokotteen valmistus

Rokote valmistetaan adsorboimalla tetanustoksoidi alumiiniumhydroksifosfaattigeeliin ja lisäämällä säilytettä (0,01 % mertiolaattia; Orion Oy käyttää bentsetoniumkloridia). Rokote säädetään sisältämään 10 Lf/ml. Tuote ampulloidaan, ja valmiista pakkauksista otetaan vielä näytteet steriilikontrollia, haitattomuuskoetta sekä tehon määrittystä varten. (10) (Liite 3)

Rokoteannos on 0,5 ml eli 5 Lf-yksikköä, sen immunisoiva teho on yli 20 kansainvälistä yksikköä (IIU).

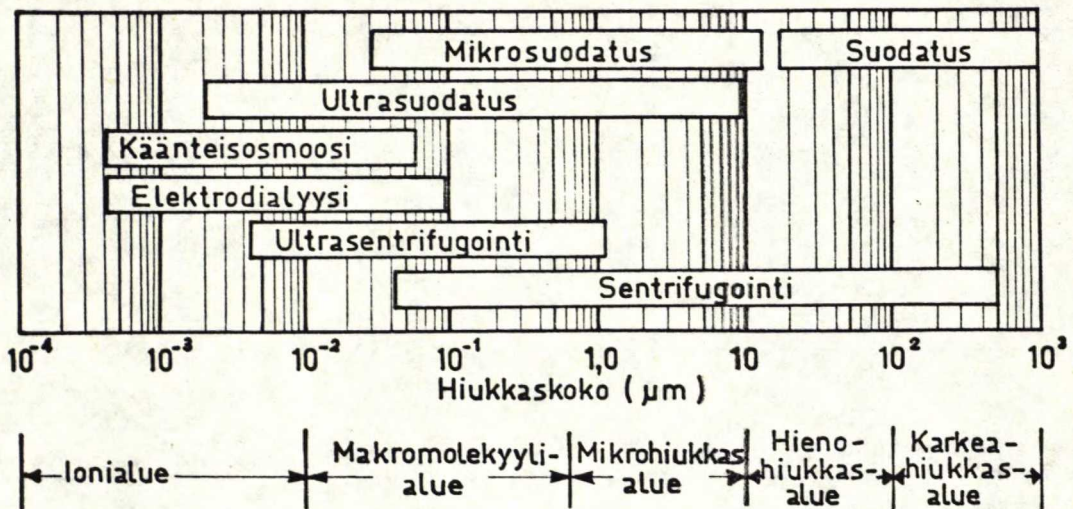
Kansanterveyslaboratorio jakoi v. 1974 tetanusrokotetta 344 792 annosta, 2-rokotetta (difteria + tet.) 119 506 annosta ja 3-rokotetta (pertussis + dift. + tet.) 264 221 annosta (15). Orion Oy möi v. 1974 tetanusrokotetta 129 000 annosta, 2-rokotteita (salmonella + tet. ja polio + tet.) yht. 69 440 annosta ja 4-rokotetta (polio + PDT) 18 470 annosta (16).

4. ULTRASUODATUS

Walliander on käsitellyt lisensiaattityössään (17) varsin laajalti ultrasuodatuksen teoriaa. Seuraavien kappaleiden sisältö on saatu pääosin hänen kirjoituksestaan.

4.1. Yleistä

Tavallisimmat aineenerotusmenetelmät, joissa käytetään kalvoja, ovat tavallinen suodatus, mikrosuodatus, ultrasuodatus, käänteisosmoosi, dialyysi ja elektrodialyysi. Neljässä ensimmäisessä menetelmässä aineenerotuksen saa aikaan paine-ero, dialyysissä kemiallinen potentiaali ja elektrodialyysissä sähkökenttä. Kalvo toimii liuoksen jonkun osakomponentin kulun estävänä kerroksena, joten kyseessä on selektiivinen kalvo. (18) Kuvassa 1 on esitetty kalvoprosessien käyttöalueet (18); mukana on myös



Kuva 1 Aineenerotusmenetelmien käyttöalueita (18)

vertailun vuoksi sentrifugointi sekä ultrasentrifugointi. Kuvasta nähdään, että kalvoprosesseja voidaan käyttää hyvin laajalla hiukkaskokoalueella.

Kun kaksi eri väkevyyistä suolaliuosta erotetaan toisistaan kalvolla, joka läpäisee vain liuotinmolekyyliä, liuotinvirta kulkee laimeammasta liuoksesta väkevämpään, kunnes pitoisuudet ovat tasaantuneet tai kunnes kalvon pintojen välinen paine-ero on yhtä suuri kuin liuosten osmoottisten paineiden erotus. Jos nyt väkevämpään liuokseen kohdistetaan paine, alkaa liuotinvirta kulkea väkevämmästä laimeampaan liuokseen. Liuotinvuo on silloin verrannollinen tasapainopaineen ylittävään paine-eroon. Kyseessä on käänteisosmoosi. Sähkökemiallisten ilmiöiden vaikutuksesta vain vähän liuenneen aineen molekyylejä läpäisee kalvon, vaikka huokosten halkaisijat voivat olla

näitä molekyylejä suuremmatkin. (17)

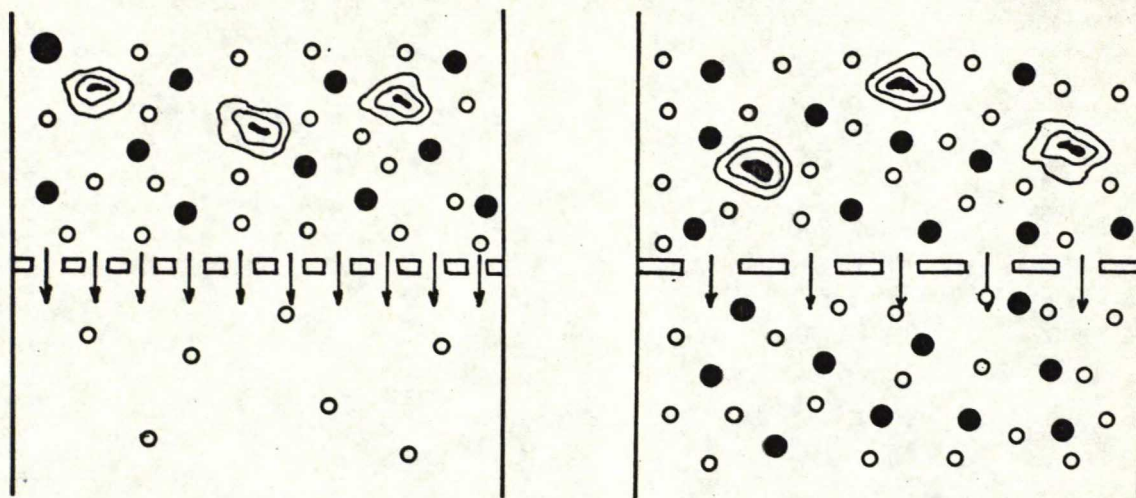
Kun huokoskokoa suurennetaan, pienenee sähkökemiallisten ilmiöiden vaikutus, ja erottumisen aiheuttaa kalvon seula-vaikutus. Aineensiirto väkevämmästä liuoksesta laimeampaan alkaa jo ennen kuin paine-ero saavuttaa osmoottisten paineiden eron. Tämä aineenerotusmenetelmä on ultrasuodatusta.

Käänteisosmoosin ja ultrasuodatuksen välille ei voida vetää selvää rajaa. Seuraavia määritelmiä voidaan kuitenkin käyttää (17):

- käänteisosmoosi on erotusmenetelmä, jossa erottuminen perustuu sähkökemiallisiin ilmiöihin ja jossa paine on suurempi kuin käsiteltävän liuoksen osmoottinen paine;
- ultrasuodatus on erotusmenetelmä, jossa erottuminen perustuu molekyylikoon mukaiseen suotautumiseen ja jossa paine voi olla pienempi kuin käsiteltävän liuoksen osmoottinen paine.

Käänteisosmoosissa käytetyt paineet ovat yleensä 3,5 ... 10 MPa ja ultrasuodatuksessa 0,2 ... 2 MPa.

Puoliläpäisevien eläinkalvojen kyky erottaa eri kokoisia molekyylejä tunnettiin jo viimevuosisadalla. Myöhemmin opittiin valmistamaan keinotekoisia kalvoja sekä myös



Kuva 2 Erottuminen käänteisosmoosisa ja ultrasuodatuksessa ○ on liuotinmolekyyli, ● on ioni ja ☉ on makromolekyyli

säätlemään huokoskokoja. Kalvot olivat kuitenkin hitaita eikä niiden läpäisyominaisuuksia hallittu riittävästi, joten uudet tarkemmat erotusmenetelmät syrjäyttivät sen käytön. 1950-luvun alussa menetelmää sovellettiin suolan poistoon vedestä, ja 1960-luvun alussa keksittiin, miten kalvoihin saadaan anisotrooppinen rakenne. (19) Kalvojen läpäisynopeus kasvoi huomattavasti tämän ansiosta, ja menetelmästä tuli kilpailukykyinen.

Porter et al. (20) ja Lacey (18) ovat vertailleet eri vedenpoistomenetelmien kustannuksia poistettua 1 000 gal vettä kohden:

selektiivinen saostus	5 000	\$
dialyysi	640....1 000	\$
kylmäkuivaus	200.... 300	\$
geelikromatografia	20.... 100	\$
jäädytyskonsentroidi	0,45.... 45	\$
spraykuivaus	17.... 50	\$
rumpukuivaus	25	\$
haihdutus ja alipainehaihdutus	0,4.... 15	\$
sentrifugointi	0,3.... 10	\$
käänteisosmoosi ja ultrasuodatus	0,2.... 5	\$
elektrodialyysi	0,2.... 5	\$

Käänteisosmoosia käytetään pääasiassa makean veden valmistukseen suolapitoisista pohjavesistä. Ultrasuodatusta käytetään suurimolekyylisten aineiden, kuten proteiinien konsentroidiin. Koska aineenerotus tapahtuu nestefaasissa ilman faasin vaihtoa, on se sopiva lämpöherkille materiaaleille, eivätkä vedenpoistokustannukset ole kovin suuret. Tällä hetkellä on taloudellisesti merkittävin sovellutus heraproteiinien kuoritun maidon konsentroidi.

(21)

4.2. Ultrasuodatuksen peruskäsitteitä

Kuvassa 3 on esitetty ultrasuodatuskalvon poikkileikkaus stationääritilanteessa (17). Konsentraatiopolarisaatio-



Kuva 3 Poikkileikkaus ultrasuodatuskalvosta suodatuksen aikana: o liuotinmolekyyli, • liuenneen aineen molekyyli

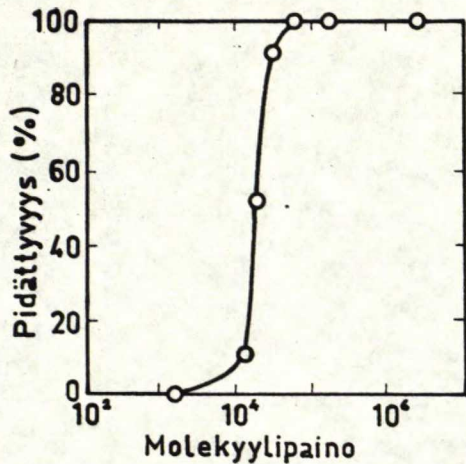
kerros, jonka osana voi olla geelikerros, muodostaa sekundaarikalvon. Kierrätysnopeus on rejektin keskimääräinen virtausnopeus kalvon pinnan suunnassa.

Kalvon pidättyvyys voidaan määritellä yhtälöllä:

$$F (\%) = (1 - C_p/C_k) \cdot 100, \quad)1($$

missä C_p on liuenneen aineen konsentraatio permeaatissa ja C_k on liuenneen aineen konsentraatio rejektissä

Cut-off-arvo ilmoittaa sen molekyylipainon, jonka kokoisilla molekyyleillä pidättyvyys on 50%. Kuvan 4 läpäisykäyrä saadaan piirtämällä pidättyvyys F molekyylipai-



testiaine	mol.paino	F (%)
Blue-dextran	2.10 ⁶	100
kollageeni	130 000	100
albumiini	67 000	100
kymotrypsino- geeni	25 000	90
trypsiini	20 000	50
sytokromi-c	14 400	10
syanokobal- amiini	1 357	0

Kuva 4 Erään ultrasuodatuskalvon läpäisykäyrä (22)

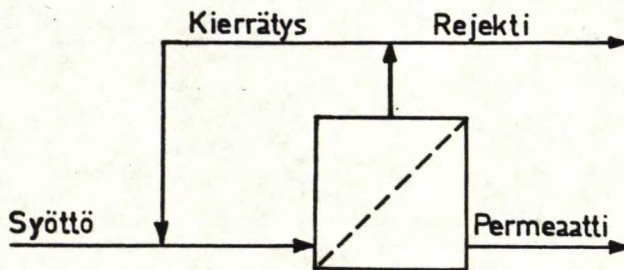
non funktiona. (22)

Kuitenkin cut-off-arvo kuvaa kalvon ominaisuuksia huonosti. Läpäisyyn vaikuttaa molekyylin muoto, molekyylin hydratoituminen sekä proteiinimolekyyleillä liuoksen ionivahvuus ja pH (molekyylin todellinen koko), käytetty paine (pidättyvyys kasvaa paineen kasvaessa) ja aineen konsentraatio (pidättyvyys kasvaa konsentraation kasvaessa). Käytettäessä heterogeenistä testiliuosta molekyylit vaikuttavat toisiinsa ja tukkivat kalvon huokosia. Pitempiaikaisessa käytössä kalvot tiivistyvät ja pidätysominaisuudet muuttuvat. Cut-off-arvoa voidaan pitää siis vain kalvon pidätysominaisuuksien suuruusluokan kuvaajana. (17)

Permeaattivuolla tarkoitetaan sitä nestemäärää, joka tulee kalvon läpi pinta-ala- ja aikayksikköä kohden.

Konsentroitisuhte on alkutilavuuden suhde lopputilavuuteen, tai moduliikäytössä kuvan 5 mukaisesti syöttövirran suhde rejektivurtaan. Käytössä on myös liuenneen aineen konsentroitisuhte, joka on loppukonsentraation suhde alkukonsentraatioon tai rejektin konsentraation suhde syötön konsentraatioon.

Kalvomoduli on tietyn kalvopinta-alan käsittävä perusyksikkö, josta voidaan koota suurempia kokonaisuuksia kytkeällä useita moduleita rinnan tai sarjaan. (17)



Kuva 5 Modulin käytön periaatekaavio

4.3. Ultrasuodatuskalvot

Rakenteeltaan kalvo voi olla isotrooppinen tai anisotrooppinen (asymmetrinen). Isotrooppisissa kalvoissa on huokoskoko vakio koko kalvon paksuudelta, anisotrooppisissa kalvoissa huokoskoko on erilainen pinnalla ja pohjalla. Nykyiset kalvot ovat yleensä anisotrooppisia. Kalvon

pinnassa on ohut tiheä erotuskerros, joka aiheuttaa pääasiallisen virtausvastuksen (90 %). (17)

Kalvon ohut pintakerros suorittaa varsinaisen erotuksen. (23) Pienet molekyylit pääsevät tunkeutumaan pintakerroksen läpi, suuret sen sijaan eivät mahdu huokosiin. Ultrasuodatuskalvon pintakerroksesta otetut mikroskooppikuvat osoittavat, että siinä on huokoskanavia, joiden kautta molekyylit pääsevät kulkeutumaan kalvon alaosaan. Kalvon alaosa toimii pintakerroksen tukirakenteena, huokokset ovat siinä niin suuria, että molekyylit läpäisevät sen helposti. (17)

Ultrasuodatuskalvojen pidättyvyys on paineen funktio. Liuotinvuo kasvaa kalvon erotuskerroksen ohentuessa (anisotrooppinen rakenne), kalvon huokoskoon suuretessa tai paine-eron kasvaessa kalvon eri puolilla.

Kaupallisten anisotrooppisten kalvojen valmistus on yleensä pidetty salassa; eniten on tietoja saatavissa selluloosa-asetaattikalvojen valmistuksesta. Selluloosa-asetaatista, asetonista ja tarvittavista lisäaineista valmistetaan liuos, joka levitetään määräpaksuuteen sopivalle alustalle, esim. lasilevyille, ja upotetaan veteen (24). Alustalle levitetyn kalvon pinnasta haihtuu liuotinta ennen veteenupotusta, jolloin polymeerin pitoisuus pinnassa nousee. Aktiivinen pintakerros jää pysyväksi polymeerin koaguloituessa upotuksen yhteydessä. Koaguloitu-

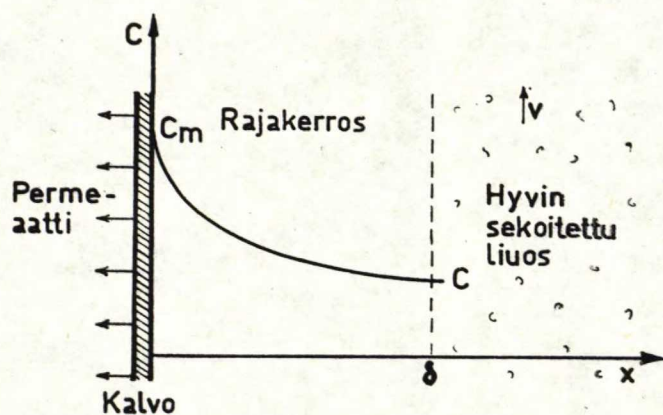
misessa syntyy rakenne, jossa pintaosa on pienempihuokoista ja pohjaosa suurempihuokoista. Huokosten väliseinät ovat epäyhtenäisiä ja sallivat nestevirtauksen huokosesta toiseen. (23)

Selluloosa-asetaatin lisäksi ultrasuodatuskalvoja valmistetaan muista selluloosaestereistä, substituoiduista olefiineistä, aromaattisista polyamideista, polyelektrolyyt-tikomplekseista, ym. (25). Niillä käytettävä pH-alue on laajempi ja lämpötilan kesto suurempi kuin selluloosa-asetaattikalvoilla, ja ne kestävät täysin mikrobien vaikutusta.

Selluloosa-asetaatti on tärkein kalvomateriaali rajoituksesta huolimatta, koska se on halpaa, kalvojen valmistus on helppoa, ja saaduilla kalvoilla on hyvät virtaus- ja erotteluominaisuudet. Selluloosa-asetaattikalvoja voidaan käyttää pH-alueella 2...7, emäksisessä liuoksessa asetyyliryhmät alkavat hydrolysoitua OH-ionien katalysoimina. Lämpötilan kesto rajoittuu 55°C, koska tätä ylemissä lämpötiloissa kalvon huokokset sulkeutuvat. Myös eräät mikrobit voivat hydrolysoida selluloosa-asetaattia, mutta se tuskin rajoittaa niiden käyttöä. Kalvot voidaan desinfioida mm. jodoforeilla, kalsiumhypokloriitilla, formaliiniliuoksella ja etanoliliuoksella. (26)

4.4. Konsentraatiopolarisaatio

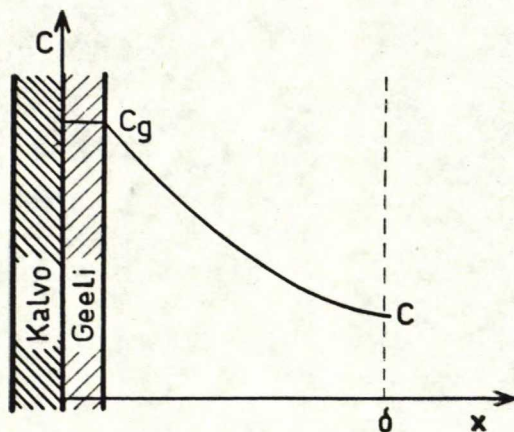
Kun kalvo läpäisee vain osittain liuenneita aineita, nämä alkavat kerääntyä kalvon pinnan läheisyyteen. Stationääritilanteessa liuenneita aineita kulkeutuu kalvon pinnalle yhtä paljon kuin niitä palautuu liuokseen ja poistuu kalvon läpi. Kuvassa 6 on esitetty tilanne kalvolla stationääritilassa (27).



Kuva 6 Konsentraatioprofiili rajakerroksessa turbulenssissa virtauksessa (27)

Liuos virtaa kalvon suunnassa nopeudella v , ja liuenneen aineen konsentraatio on C . Kalvon pinnan läheisyyteen muodostuu laminaarikerros, jonka paksuus on δ . Nesteen virtausnopeus pienenee lähestyittäessä kalvoa. Liuenneen aineen konsentraatio kohoaa huippuarvoonsa C_m kalvon pinnalla.

Konsentraatiopolarisaation aiheuttama konsentraation nousu kalvon pinnan läheisyydessä voi muuttaa liuoksen ominaisuuksia, jolloin kalvon pinnalle syntyy hitaastiliikkuva tai paikallaan oleva geelikerros. Tämä vaikuttaa kalvon läpäisevyyteen pienentäen vuon arvoa. Kuvassa 7 on esitetty konsentraatioprofiili tällaisessa tilanteessa (17).



Kuva 7 Konsentraatioprofiili rajakerroksessa geelikerroksen muodostumisen jälkeen (17)

Konsentraatio, jossa makromolekyylit aiheuttavat muutoksia liuoksen ominaisuuksiin, riippuu näiden molekyylien muodosta, koosta, hydratoitumisen tai solvatoitumisen asteesta sekä niiden polymeroitumis- ja agglomeroitumistaipumuksista. Eräillä pitkäketjuisilla polysakkarideilla muutoksia esiintyy jo alle 1 % (w/w) liuoksilla, proteiineilla yleensä vasta 10...30 % (w/w) liuoksilla.

Muodostunut geelikerros toimii sekundaarikalvona ja vastustaa liuotinvuota. Liuotinvuolle saadaan seuraava riippuvuus (27):

$$J = \frac{\Delta p}{R_g + R_m} \quad)2($$

missä

J on liuotinvuo

Δp on paine-ero kalvolla

R_g on geelikerroksen aiheuttama virtausvastus

R_m on kalvon aiheuttama virtausvastus

Geelikerroksen paksuus kasvaa, kunnes liuenneen aineen virtaus kalvolle on yhtä suuri kuin liuenneen aineen diffuusio takaisin liuokseen (27):

$$J C - D \frac{dC}{dx} = 0 \quad)3($$

missä

$\frac{dC}{dx}$ on liuenneen aineen konsentraatiogradientti etäisyydellä x

D on liuenneen aineen diffuusiokerroin

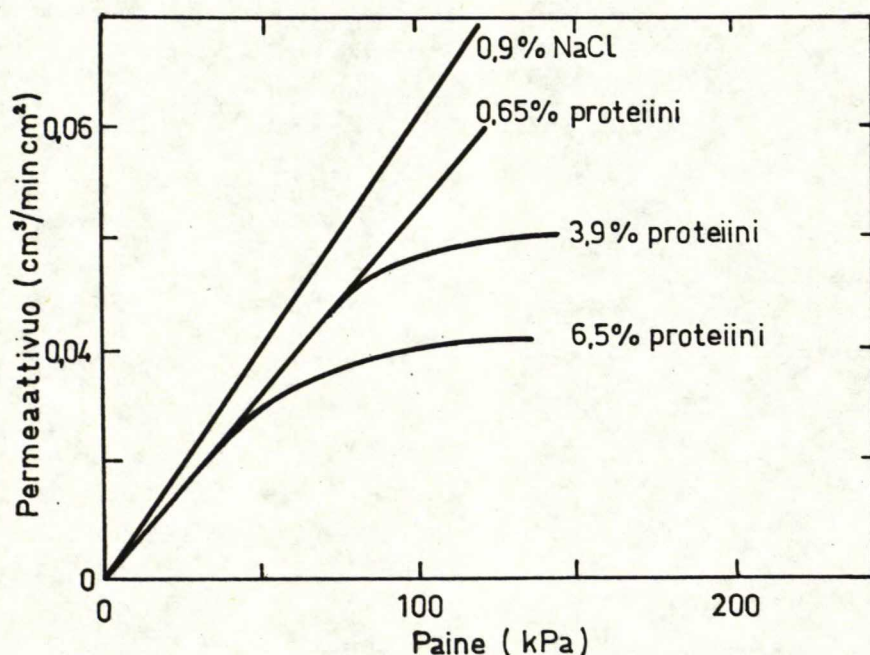
Jos oletetaan, että D on konsentraatiosta riippumaton käytetyllä alueella ja että liuennut aine pysyy liuenneena myös konsentraatiossa C_g , saadaan kaavasta 3 (27):

$$J = k \cdot \ln \frac{C_g}{C} \quad)4($$

$$C_g/C = \exp(J/k) \quad)5($$

Koska C_g on vakio, on myös suhde C_g/C vakio. Jos siis painettanostamalla pyritään nostamaan liuotinvuota J , on siitä seurauksena geelikerroksen paksuneminen ja vastuksen lisääntyminen. Jos paineen kohottaminen tiivistänyt geelikerrosta, voi liuotinvuo jopa pienentyä. (27)

Kuvassa 8 on esitetty permeaattivuon (J) riippuvuus paineesta vakio-olosuhteissa, kun käsiteltävä liuos on naudan seerumialbumiini (27). Aluksi liuotinvuo nousee paineen mukana, mutta muuttuu sitten paineesta riippumattomaksi, kun konsentraatio kalvolla nousee geeliytymiskonsentraatioon.



Kuva 8 Naudan seerumialbumiinin ultrasuodatus sekoite-
tussa kennossa (27)

Syntynyt geelikerros pysyy kalvolla, vaikka olosuhteita muutettaisiin. Se voidaan poistaa kalvon pinnalta vain tehokkaalla pesulla (28). Mahdollisimman suuren permeaattivuon saamiseksi on olosuhteet pidettävä sellaisina, ettei geelikerrosta synny tai että sen paksuus on mahdollisimman pieni.

4.5. Ultrasuodatuslaitteistot

Laitteiden suunnittelussa on tärkeää saada konsentraatiopolarisaatio mahdollisimman pieneksi. Laminaarivirtauslaitteissa tämä saadaan aikaan suurella leikkausnopeudella, turbulenssivirtauslaitteissa suurella turbulenssilla. Laminaarivirtauslaitteissa virtauskanavat ovat matalia, ja laitteen nestekapasiteetti, rejektin tilavuus kalvon pinta-alayksikköä kohden, on pieni. Turbulentilla virtauksella toimivissa laitteissa virtauskanavat ovat suurempia ja nestekapasiteetti siten suurempi. (17)

Modulirakenteen perusteella voidaan erottaa seuraavat päätyypit (18, 29):

- Plate-and-frame-tyyppi: moduli koostuu useasta huokoisesta kalvopohjasta, kalvosta ja virtausohjaimesta. Virtausohjaimissa kanavat voivat olla suoria tai spiraalimaisia ja urasyvyys sellainen, että laite toimii

laminaarilla tai turbulentilla alueella. Tämän tyypin etuina ovat pieni nestekapasiteetti ja tilantarve kalvon pinta-alayksikköä kohden. Haittoja ovat hankala puhdistettavuus ja kalvojen vaihto.

- Putkityyppi: kalvo on valettu huokoisen lasikuituputken sisäpinnalle ja permeaatti tihkuu ulkopuolelle. Putkia voidaan liittää useita rinnan. Puhdistaminen on yksinkertaista, rikkoutunut elementti on helppo vaihtaa uuteen, eikä laite tukkeudu kovin nopeasti karkeastakaan kiintoaineksesta. Haittoja ovat suuri nestekapasiteetti ja tilantarve.
- Kääretorttutyyppi: tässä tyypissä rejekti ja permeaatti virtaavat huokoisessa väliaineessa. Kalvo on sijoitettuniiden väliin. Väliaineet ja kalvo kierretään keskusputken ympärille, jolloin poikkileikkaus muistuttaa kääretorttua. Etuina tällä tyypillä ovat pieni nestekapasiteetti ja tilantarve, haittana vaikea puhdistettavuus.
- Kotelotyyppi: kalvot on valettu huokoisten lamellien pinnalle, rejektin virtaus tapahtuu lamellien suunnassa poikkileikkaukseltaan suorakulmaisessa kotelossa. Tämän mallin etuina ovat pieni nestekapasiteetti ja tilantarve, haittoina monimutkainen rakenne ja vaikea puhdistettavuus.
- Kuitutyyppi: kalvoaineksesta on valmistettu ohuita kappillaareja, joissa on tiheä erotuskerros joko sisä-

tai ulkopinnalla. Kapillaareista kootaan kimppuja, joissa on useita tuhansia kuituja. Tilantarve on hyvin pieni, samoin nestekapasiteetti. Laite on vaikea puhdistaa ja kuidut tukkeutuvat helposti.

4.6. Kasvatusliuosten konsentrointi ultrasuodatuksella

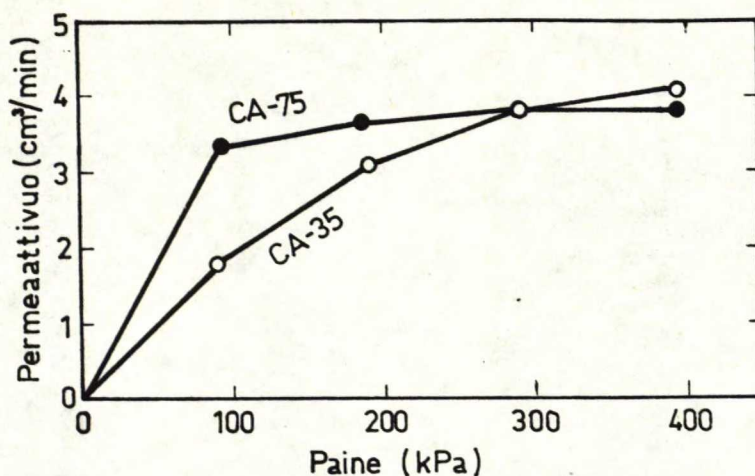
Walliander (17) on lisensoitettutyössään kokeillut erilaisia ultrasuodatuskalvoja ja laitteita konsentroiden ja puhdistuen Bacillus subtilis-kasvatusliuoksia.

4.6.1. Olosuhteiden vaikutus permeaattivuohon

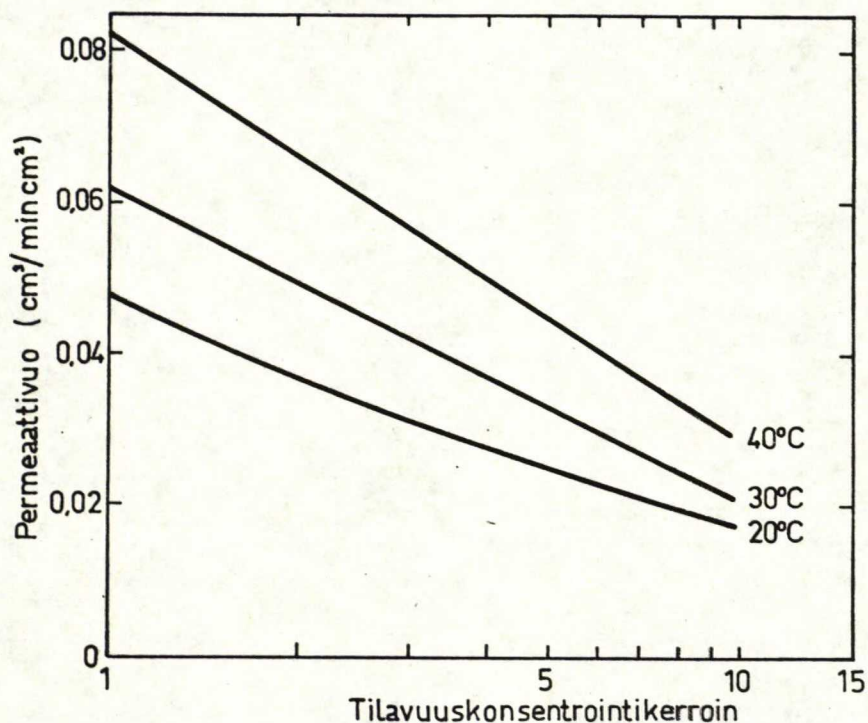
Ultrasuodatuksessa liuotinta virtaa kalvon läpi paineen vaikutuksesta. Pienillä paineilla vuo on lineaarisesti paineesta riippuva, mutta muuttuu paineen kasvaessa siitä riippumattomaksi konsentraatiopolarisaation ja sekundaarikalvon muodostumisen vaikutuksesta. Kuvassa 9 on esitetty kahden omatekoisen selluloosa-asetaattikalvon permeaattivuo paineen funktiona. Käyristä on todettavissa, että permeaattivuo muuttuu paineesta riippumattomaksi jo noin 200...300 kPa paineessa.

Kuvassa 10 on esitetty permeaattivuon riippuvuus lämpötilasta.

Kierrätysnopeuden nosto lisää turbulenssia virtauskanavassa ja ohentaa laminaarikerrosta kalvon pinnalla,

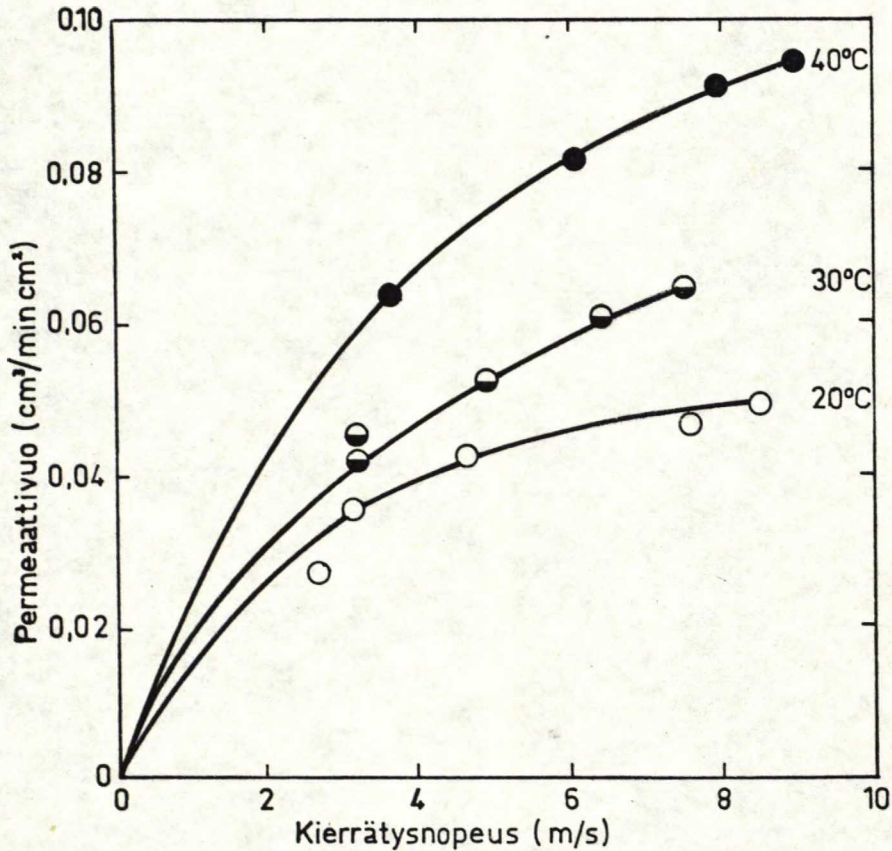


Kuva 9 Permeaattivuon riippuvuus paineesta omatekoisilla selluloosa-asetaattikalvoilla. Ohutkanavalaitteessa kierrätysnopeus on 1,36 m/s, lämpötila 20°C, virtausura 0,6 mm × 5 mm. (17)



Kuva 10 B. subtilis-kasvatuliuoksen konsentrointi 20°C, 30°C ja 40°C lämpötilassa CA-75-kalvolla (kierrätysnopeus 7,4 m/s, paine 430 kPa) ohutkanavalaitteessa (virtausura 0,6 mm × 5 mm) (17)

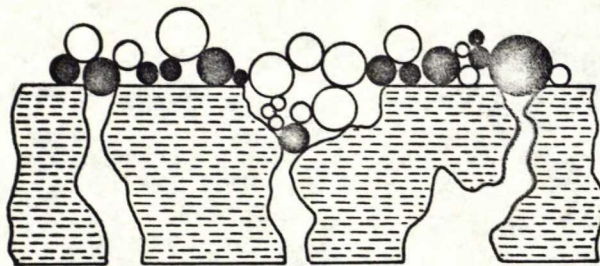
jolloin konsentraatiopolarisaatio pienenee. Kuvassa 11 on esitetty kierrätysnopeuden vaikutus permeaattivuohon kolmessa lämpötilassa vakioaineessa (30).



Kuva 11 Kasvatusliuoksen kierrätysnopeuden vaikutus permeaattivuohon 20°C, 30°C ja 40°C lämpötilassa CA-75-kalvoilla. Virtauskanavan poikkileikkaus 0,6 mm 5 mm. 20°C paine 470...510 kPa, 30°C paine 500...530 kPa ja 40°C paine 510...560 kPa (30)

Tarkasteltaessa permeaattivuon suhdetta kalvon huokoskokoon havaitaan, että huomattavakaan huokoskoon lisäys ei lisää merkittävästi permeaattivuota. (Permeaattivuo

kasvaa noin 5-kertaiseksi, kun huokoskoko kasvaa 1000-kertaiseksi.) Syynä tähän on proteiineista syntyvän sekundaarikalvon vaikutus. Tiheimmillä proteiinit pidättävillä ultrasuodatuskalvoilla konsentraatiopolarisaatio aiheuttaa konsentraation nousun kalvon pinnalla, jolloin sekundaarikalvo muodostuu. Huokoisilla kalvoilla liuoksen sisältämät kolloidiset hiukkaset ja vaihtelevan kokoiset kiintoaineshiukkaset aiheuttavat kuvan 12 mukaisesti huokosten tukkeutumista. Tällöin kalvon todellinen huokoskoko pienenee niin, että proteiineista muodostuva sekundaarikalvo voi syntyä. Kun se on päässyt muodostumaan, se on hyvin pysyvä. Sekundaarikalvon hydraulinen vastus on huomattavasti suurempi kuin primaarikalvon, joten se määrää pääasiassa systeemin permeaattivuon. (17)



Kuva 12 Kaavakuva huokoisen ultrasuodatuskalvon tukkeutumisesta (31)

KOKEELLINEN OSA

5. MATERIAALIT

5.1. Tetanustoksoidi

Käytetty tetanustoksoidi oli valmistettu Kansanterveyslaboratorion keskuslaboratoriossa. Se oli ns. raakatoksoidia: kasvuliuosta, josta oli poistettu bakteerisolut ja jossa formaldehydi oli saanut vaikuttaa useita viikkoja. Siinä oli proteiinia n. $0,3 \text{ mg/cm}^3$ ja Lf-yksiköitä n. 35 yks/cm^3 .

5.2. Ultrasuodatuskalvot

Työssä käytettiin omatekoisia selluloosa-asetaattikalvoja. Kalvot valmistettiin van Oss et al. (24) esittämällä tavalla. Materiaaleina käytettiin selluloosadiasetaattia (4644 Eastman Cellulose Acetate, Acetyl Content 39,8%), formamidia ja asetonia.

Kalvojen valmistus tapahtui seuraavasti: 75 ml asetonia ja 35...75 ml formamidia laitettiin 500 ml imupulloon, liuokseen lisättiin hitaasti 25 g selluloosa-asetaattia, ja seosta sekoitettiin magneettisekoittajalla, kunnes saatiin

kirkas viskoosi liuos. Ilmakuplat poistettiin 55°C lievällä alipaineella.

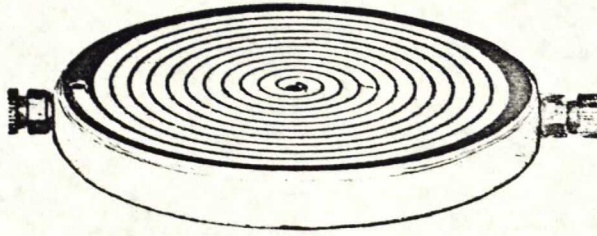
Seos levitettiin levykromatografian levityslaitteella lasilevyille 0,25 mm paksuksi kalvoksi. Levyt upotettiin välittömästi jääveteen, jossa ne saivat olla vähintään tunnin ajan. Valmiit kalvot irroitettiin lasilta ja säilytettiin +4°C n. 20 % etanolissa.

Formamidin määrää vaihtelemalla saatiin permeaattivuoltaan erilaisia kalvoja. Kalvoja merkittiin formamidin ml-määrän (35...75 ml) mukaisesti CA-35...CA-75. CA-35 oli permeaattivuoltaan hitain ja CA-75 nopein.

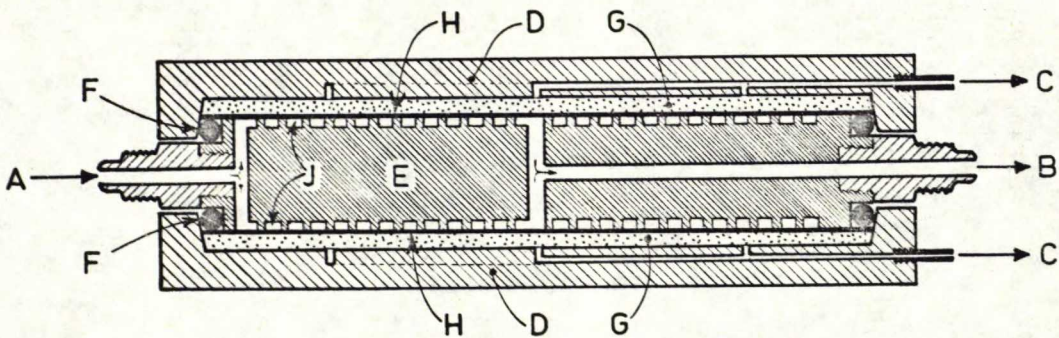
6. LAITTEISTO

Ultrasuodatuslaitteena käytettiin Teknillisen Korkeakoulun kemian osastolla valmistettua laitetta. Rejektivirtaa kalvon pinnalla virtausohjaimessa olevaa spiraali- maista uraa myöten. Kuvassa 13 on esitetty virtausohjain. Ura on virtausohjaimen molemmilla puolilla, joten modulissa on kaksi kalvoa.

Kuvassa 14 on esitetty modulin rakennekaavio. Moduilit oli liitetty rinnan kahden tai kolmen modulin pakaksi. Kalvojen halkaisija oli 150 mm. Virtauskanavan leveys oli 5 mm, syvyys 2,5 mm ja pituus 2,30 m. Tehollinen



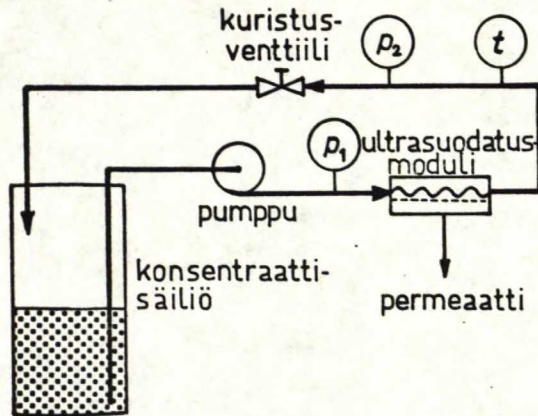
Kuva 13 Spiraalimainen ura virtausohjaimessa



Kuva 14 Läpileikkaus työssä käytetystä ultrasuodatusmodulista

A Konsentroitavan liuoksen syöttö	E Virtausohjainlevy
B Konsentraatin poisto	F Tiivistysrenkaat
C Permeaatin poisto	G Huokoinen aluslevy
D Pohjalevy	H Ultrasuodatuskalvo
	J Virtausohjaimen ura

kalvopinta-ala oli 118 cm^2 . Virtausohjainlevyt ja pohjalevyt oli tehty nailonista, huokoiset pohjalevyt olivat sintrattua PVC:tä. Konsentraatin kierrätykseen käytettiin hammasrataspumppua, jonka kierroslukua säädettiin variaattorilla. Laitteen virtauskaavio on kuvassa 15.

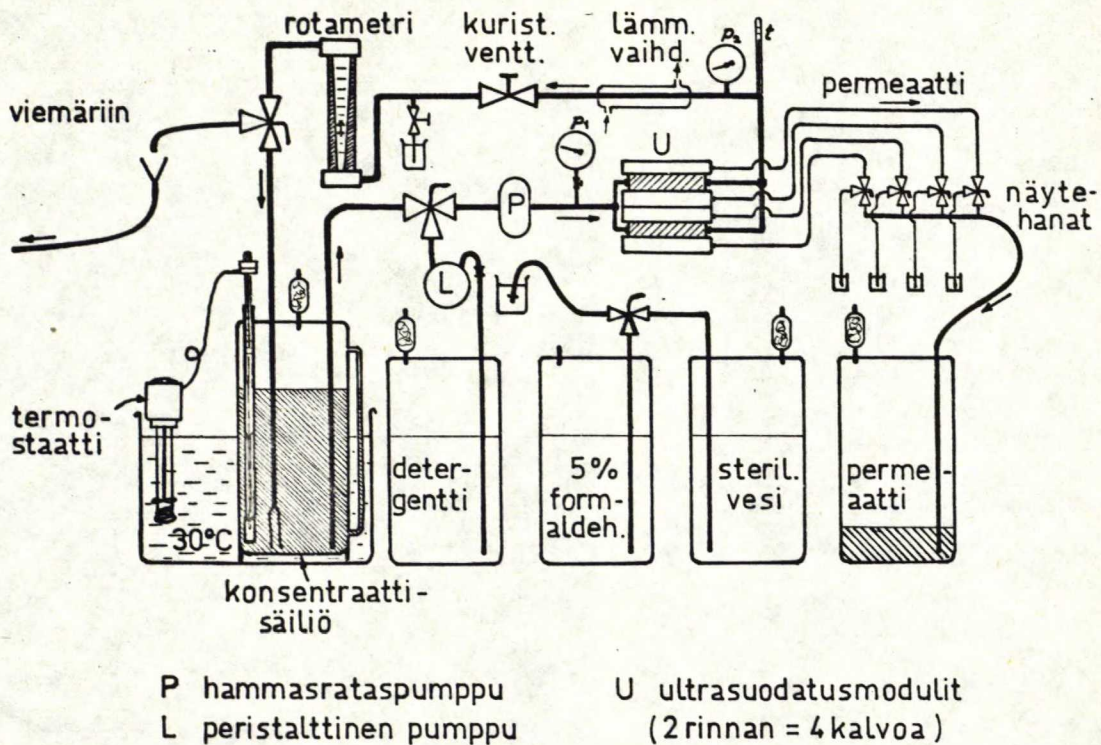


Kuva 15 Työssä käytetyn laitteen virtauskaavio

6.1. Koejärjestelyt ja kokeiden suoritus

Toksoidin kontaminoitumisen sekä aerosolien vapautumisen estämiseksi laitteesta pyrittiin tekemään täysin suljettu. Lisäksi laitteisto sijoitettiin umpinaiseen kaappiin, joka oli varustettu UV-lampulla ilmatilan pitämiseksi mahdollisimman vapaana mikrobeista. Kaavakuva laitteistosta on esitetty kuvassa 16.

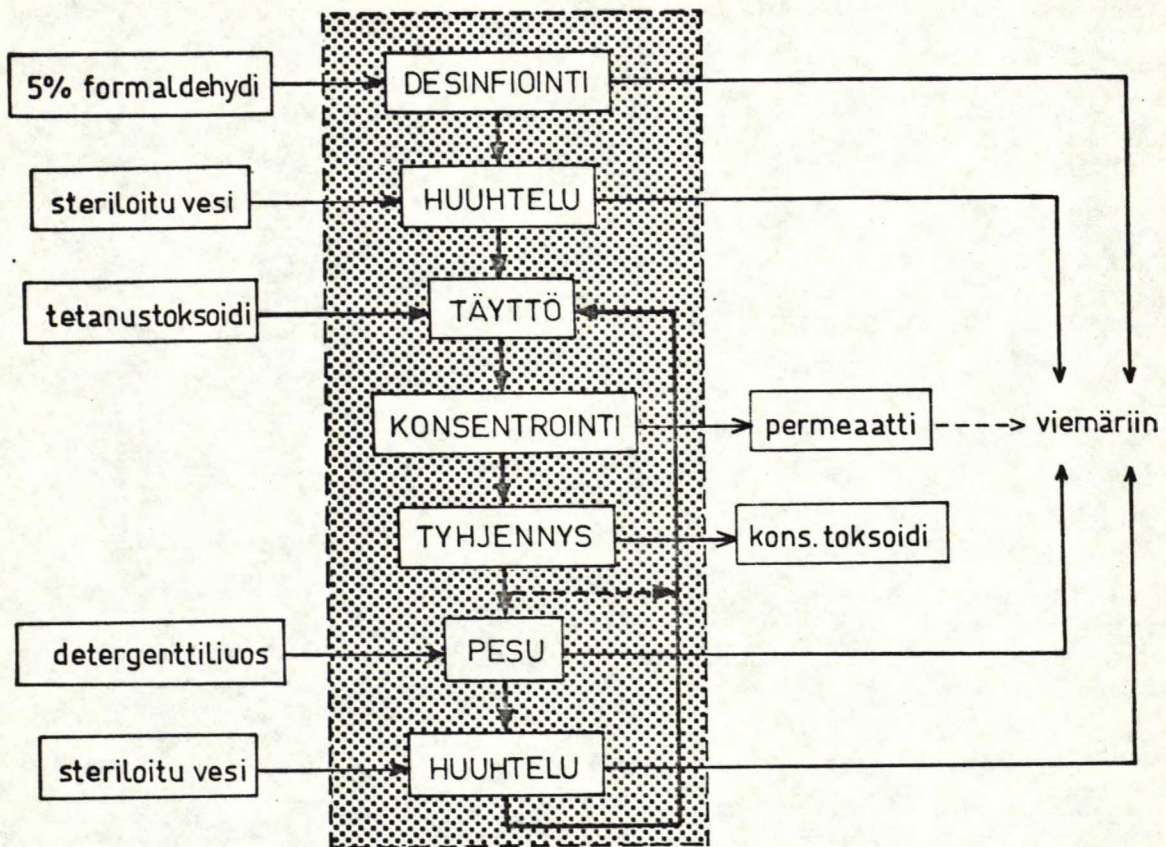
Konsentroidi suoritettiin panosprosessina sekä myös puolijatkuvana prosessina, jolloin konsentraattisäiliöön pumpattiin uutta toksoidia konsentroidinnin aikana. Kuvassa 17 on esitetty konsentroidintiprosessin eri vaiheet.




Kuva 16 Kaavakuva työssä käytetystä ultrasuodatuslaitteistosta.

Työn toisessa vaiheessa toksoidi konsentroitiin suurentamalla kalvopinta-ala nelinkertaiseksi. Pinta-alaa lisättiin liittämällä neljä neljän kalvon suodatusyksikköä sarjaan sekä rinnan. Laitteiston kaavakuva on kuvassa 18.

Laite steriloitiin ennen käyttöä. Konsentraattisäiliö steriloitiin erikseen autoklaavissa, samoin toksoidin pumppauksessa tarvittavat letkut. Laitteiston muissa osissa kierrätettiin 5 % formaldehydiä letkupumpun avulla muutaman tunnin ajan, minkä jälkeen formaldehydiliuos sai



Kuva 17 Kaavakuva konsentroidintilaitteiston toiminnasta

 konsentroidintyksikkö

olla laitteistossa yön yli. Tämän jälkeen formaldehydi poistettiin, ja laitteiston läpi pumpattiin steriloitua vettä. Toksoidisäiliö yhdistettiin muuhun laitteistoon liekittämällä putkien suut ennen liittämistä. Tämän jälkeen raakatoksoidi siirrettiin toksoidisäiliöön letkupumpun avulla. Seuraavaksi käynnistettiin kierrätyspumppu sekä säädettiin rejektin virtausnopeus ja paine sopiviksi. Otettiin näytteet sekä konsentraatista että permeaatista ja määritettiin niistä proteiini ja Lf-yksiköt.

Permeaatti palautettiin esikokeissa takaisin konsentraattisäiliöön, konsentroidintikokeissa se otettiin talteen.

Kokeet oli tarkoitus suorittaa aseptisesti, niin ettei toksoidiin olisi tarvinnut lisätä mitään säilyteainetta. Laitteessa oli kuitenkin liian paljon liitoksia ja taskuja, joten toksoidi pääsi kontaminoitumaan esikokeiden aikana. Syynä oli jonkin liitoksen vuoto tai jokin laitteiston osa, johon desinfiointi ei ollut tarpeeksi vaikuttanut. Tämän vuoksi konsentroidintikokeissa käytettiin toksoidia, johon oli lisätty 0,01 % mertiolaattia.

7. ANALYYSIMENETELMÄT

7.1. Proteiinin määrittäminen

Proteiini määritettiin Lowry et al. (32) mukaan seuraavasti:

Reagenssit:

A : 2 % Na_2CO_3

B₁ : 1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

B₂ : 2 % Kaliumnatriumtartraatti

D : karbonaatti-kupari-liuos (säilyy vain päivän):

sekoitetaan 50 ml reag. A ja 1 ml reag. B (=B₁+B₂)

sekoitet. 1:1 vasta
tarvittaessa (=reag. B)

E : 1-N:ksi laimennettu Folin-reagenssi (miel. vain päivän tarve) (Folin-Ciocalteu'n fenolireagenssia titrataan NaOH:lla fenolftaleiinin päätepisteeseen. Titrauksen perusteella Folin-reagenssi laimennetaan 1-N:ksi (n.1:1))

Suoritus:

- koeputkeen pipetoidaan 0,3 ml näytettä 1-N NaOH:ssa
- lisätään 3 ml reagenssia D, sekoitetaan ja annetaan seistä 10 min huoneenlämmössä
- lisätään nopeasti 0,3 ml reagenssia E ja sekoitetaan välittömästi ja annetaan seistä 30 min
- mitataan absorbanssi 750 nm käyttäen O-koetta vertailunäytteenä

Standardina käytettiin naudan plasma-albumiinia (Sigma Chemicals Co.). Standardikäyrä on esitetty kuvassa 20.

7.2. Typpimääritys mikro-Kjeldahl-menetelmällä (33)

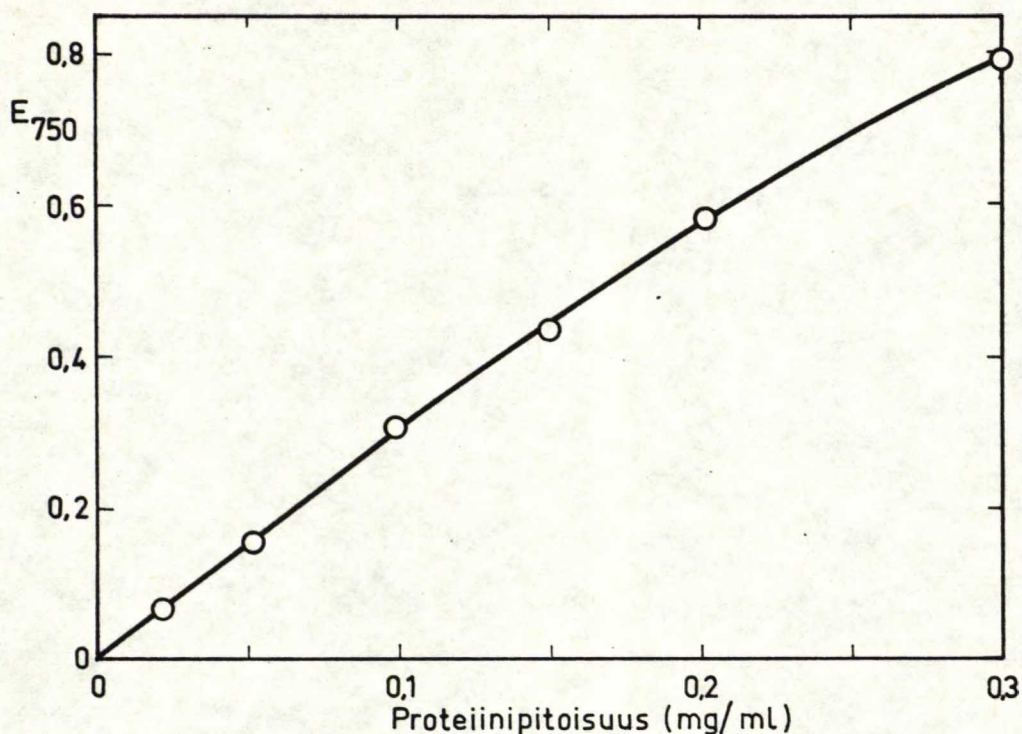
(mittausalue 0,2...1,0 mg N)

Reagenssit:

Vesi: tislattu ja ionivaihdettu ammoniakittomaksi

Elohopeasulfaattiliuos: 13,7 g HgSO_4 liuotetaan ja laimennetaan 100 ml:ksi 2 M H_2SO_4 :llä

Tislausemäs: 600 g NaOH p.a. liuotetaan 2000 ml H_2O mittapullossa (pullo täytetään 4/5). Lisätään 40 g



Kuva 20 Proteiininmäärityksen standardikäyrä

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Annetaan liueta ja täytetään merkkiin.

Indikaattori: 100 ml 0,1 % bromikresolivihreää (50 % EtOH:ssa)
20 ml 0,1 % metyylipunaa (50 % EtOH:ssa)

Boorihappo: 40 g H_3BO_3 p.a. 2000 ml H_2O

Poltto:

Polttokolviin (til. n. 30 ml) lisätään suppilon avulla 1,5 g K_2SO_4 p.a., 1,5 ml H_2SO_4 p.a., 0,5 ml HgSO_4 -liuosta ja näyte (maks. tilav. 5 ml). Kolvin seinämät huuhdellaan pienellä vesimäärällä. O-kokeisiin lisätään näytteen

tilavuus vettä. Kuumentaminen sähköhauteella aloitetaan varovasti. Erittäin voimakkaan kuohumisen voi estää muutamalla pisaralla etanolia. Höyryäminen kestää n. 5 min. Kirkastumisen jälkeen kuumennetaan kolveja 20 min (lämpöt. 370...385°C) ja seurataan voimakasta refluksointia. Polton jälkeen kolvien annetaan hieman jäähtyä (liian pitkä jäähdytys aiheuttaa K_2SO_4 kiteytymisen) ja laimennetaan polttoseos 5 ml vettä.

Tislaus: (Parnas-Wagner-laite)

Etuastiaan mitataan 15 ml 2 % boorihappoa. Polttokolvin sisältö kaadetaan tislauslaitteeseen, jonka jälkeen kolvit huuhdotaan 2×2,5 ml vettä ja kaadetaan tislauslaitteeseen. Sen jälkeen mitataan vielä 5 ml vettä polttokolviin. Tislauslaitteeseen pipetoidaan 15 ml tislausemästä ja sen jälkeen kaadetaan laitteeseen kolvista viimeinen pesuvesi (5 ml). Tislaus aloitetaan. Kiehumisen laskeaan siitä hetkestä, jolloin jäähdyttäjän yläosaan kondensoituvat ensimmäiset pisarat. Tislataan 3 min pitäen jäähdyttäjän putki nestepinnan alla. Sen jälkeen tislataan 2 min putki nestepinnan yläpuolella.

Titrataan 0,01-N H_2SO_4 -liuoksella. Näytteen ja O-kokeen haponkulutusten erotus ml:ssa kerrottuna 0,14 antaa mg N/ml.

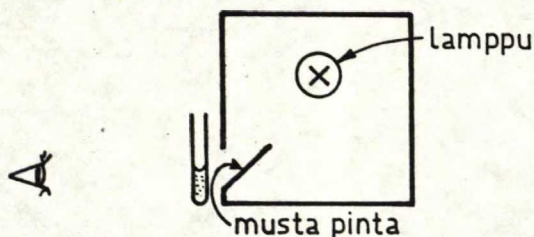
Proteiinityypimääritys: Näyte saostetaan lasisessa sentrifugiputkessa 50 % trikloorietikkahapolla, esim. 9 ml

laimeaa proteiiniliuosta + 1 ml 50 % TCA. Proteiini saostuu tunnissa huoneenlämmössä. Sentrifugoinnin jälkeen proteiinisakka pestään kahdesti 10 ml 2 % TCA. Näyte liuotetaan 2 ml 10 % NaOH ja laimennetaan sopivasti.

7.3. Toksoidin määrittäminen sakkautusreaktiolla (Lf-määritys)

Materiaali:

- tetanusantitoksiini (Tetanus Antitoxin FP. 1833/36A, 2400 units/ml, Wellcome Research Laboratories)
- näyte, joka on laimennettu niin, että sen todennäköinen Lf-yksikkömäärä on 20...40 Lf/ml
- naarmuttomia pieniä koeputkia (Ø 1 cm)
- mikrobyretti (Agla Micrometer Syringe)
- valaisulaite, joka suuntaa häikäisemättömän valon tummaa taustaa vasten oleviin putkiin (kuva 21)
- 56°C vesihaude



Kuva 21 Koeputkien tarkastelulaite

Suoritus:

- 5...6 koeputkeen mitataan mikroyretillä nouseva sarja tetanusantitoksiinia (esim 2,5 tai 5 yksikön välein), niin että antitoksiiniyksikkömäärät ovat 20...40 yks.
- lisätään putkiin 1 ml sopivaksi laimennettua näytettä, sekoitetaan ja laitetaan vesihauteeseen
- putkia tarkastellaan sopivin välein valaisulaitteessa, kunnes yhdessä putkista havaitaan kevyt hiutalemainen saostuma: tämä putki sisältää lähinnä yhtäsuuret yksikkömäärät antitoksiinia ja toksoidia

Saostuman muodostumisaika riippuu toksoidin puhtaudesta ja Lf-alueesta. Puhtaampi toksoidi ja korkeammat Lf-arvot tuottavat saostuman nopeammin. Myös lämpötila vaikuttaa voimakkaasti saostumisaikaan.

8. KOKEET OMATEKOISILLA ULTRASUODATUSKALVOILLA

8.1. Esikokeet

Tetanustoksoidin konsentrointiin sopivan kalvon löytämiseksi testattiin esikokeissa kolmea selluloosa-asetaattikalvoa: CA-35, -50 ja -75. Esikokeissa ei suoritettu konsentrointia, vaan permeaatti palautettiin konsentraatin

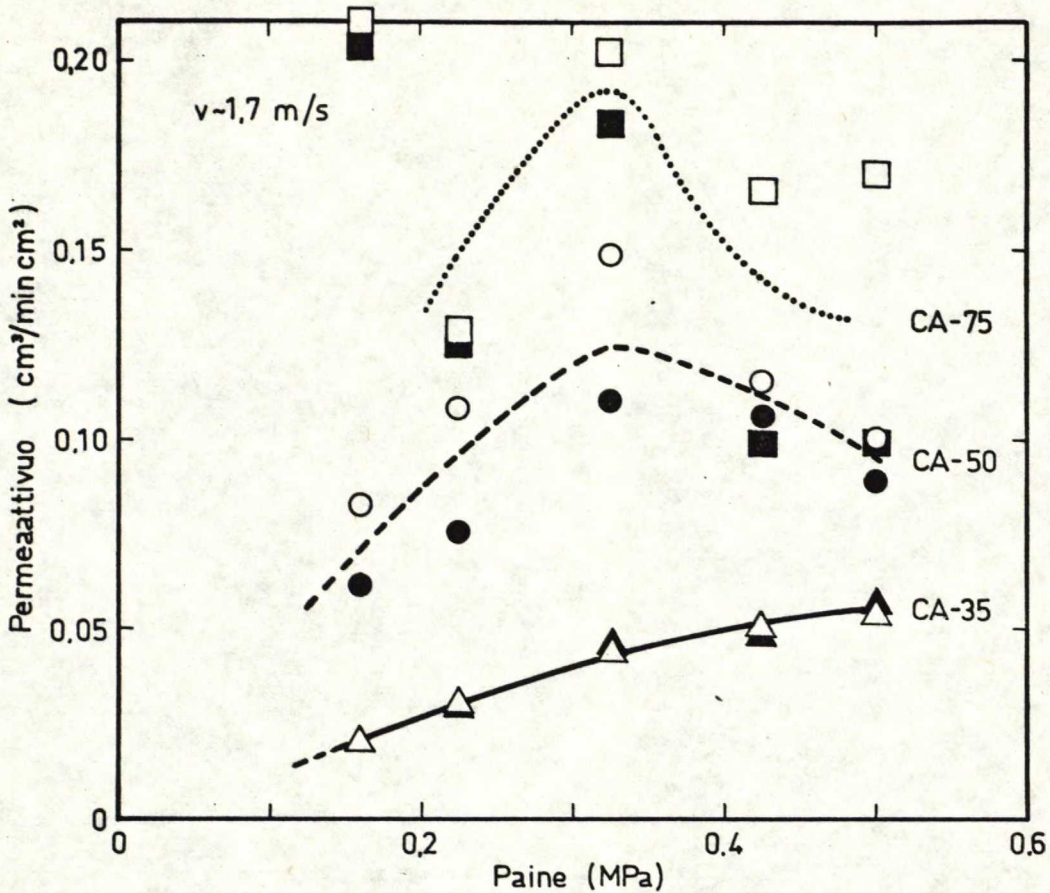
sekaan.

Kalvoja oli laitteessa kuusi rinnan, kaksi kutakin tiheyttä. Kokeissa muutettiin painetta kierrätysnopeuden ollessa vakio ja mitattiin permeaattivuo kultakin kalvolta. Toksoidin lämpötila oli noin 30°C (lämpötila pyrki kohoamaan suuremmilla paineilla, eikä lämmönvaihdin ollut riittävän tehokas lämpötilan pitämiseksi tasaisena).

Kierrätysnopeuksia oli neljä (1,7, 2,2, 2,5 ja 2,7 m/s), ja permeaattivuo paineen funktiona mitattiin kullakin erikseen. Kierrätysnopeuksien erot olivat kuitenkin siksi pienet, että muutoksen vaikutusta ei voitu havaita permeaattivuossa (vrt. kuva 11). Kuvissa 22 ja 23 on esitetty permeaattivuo paineen funktiona pienimmällä ja suurimmalla kierrätysnopeudella (suurimmalla nopeudella on pelkästään putkivastuksesta aiheutuva paine noin 0,3 MPa, kuva 23). Kokeet suoritettiin peräkkäin käyttämällä samoja kalvoja ja pesemättä tai huuhtelematta niitä välillä.

Ensimmäisessä mittauksessa (kuva 22) havaittiin, että kalvot CA-75 ja CA-50 tukkeutuivat nopeasti, kun paine nousi yli 0,3 MPa, ja permeaattivuo pieneni paineen kasvaessa. Tukkeutuminen jäi pysyväksi, niin että kun koe uusittiin, oli näiden kalvojen permeaattivuo miltei paineesta riippumaton (kuva 23).

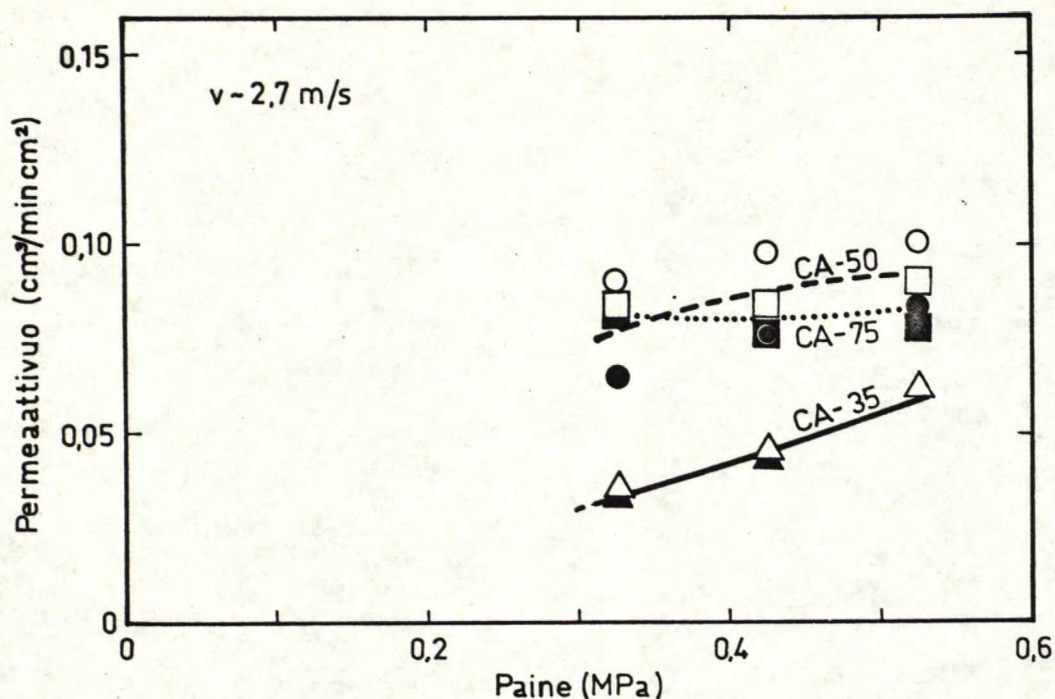
Tehtiin siis neljä koetta, joissa mitattiin permeaattivuo paineen funktiona. Kalvot tukkeutuivat vähitellen



Kuva 22 Permeaattivuo paineen funktiona kalvoilla
CA-75 (□.....■), CA-50 (○---●) ja CA-35 (Δ—▲)
Rejektin virtausnopeus kalvoa pitkin n. 1,7 m/s

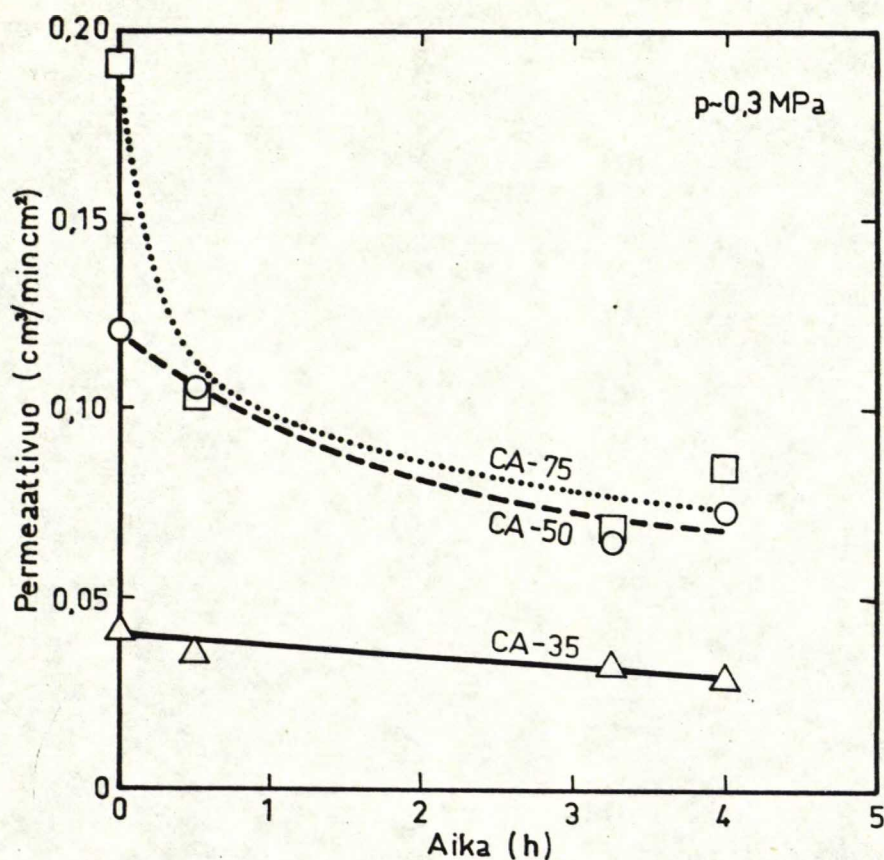
vaikka rejektin konsentraatio pysyi vakiona. Kuvassa 24 on esitetty permeaattivuon muutos näiden neljän esikokeen aikana 0,3 MPa paineella. Alussa tapahtuva vuon nopea pieneneminen kalvoilla CA-75 ja CA-50 johtui siis paineen aiheuttamasta kalvojen tukkeutumisesta ensimmäisessä kokeessa, sen jälkeen vuon pieneneminen on hitaampaa.

Permeaattinäytteistä saostettiin proteiini trikloorietik-



Kuva 23 Permeaattivuo paineen funktiona kalvoilla
CA-75 ($\square \cdots \blacksquare$), CA-50 ($\bullet \cdots \circ$) ja CA-35 ($\Delta \cdots \blacktriangle$)
Rejektin virtausnopeus kalvoa pitkin n. 2,7 m/s

kahapolla (TCA), ja se liuotettiin tämän jälkeen 1-N NaOH:iin sekä määritettiin Lowry et al. (32) mukaan. Kalvot läpäissyttä toksoidia ei pystytty havaitsemaan permeaatista Lf-määrityksen avulla. Kuitenkin permeaatin proteiinipitoisuuden havaittiin CA-75-kalvoilla olevan niin suuri, että konsentrointikokeisiin valittiin CA-50, jolla proteiinin läpäisevyys oli pieni. CA-35 ei läpäissyt proteiinia lainkaan, mutta se oli permeaattivuoltaan niin hidas, ettei sitä tässä vaiheessa kokeiltu konsentroidiin.



-Kuva 24 Permeaattivuo ajan funktiona, kun konsentroitintia ei suoriteta

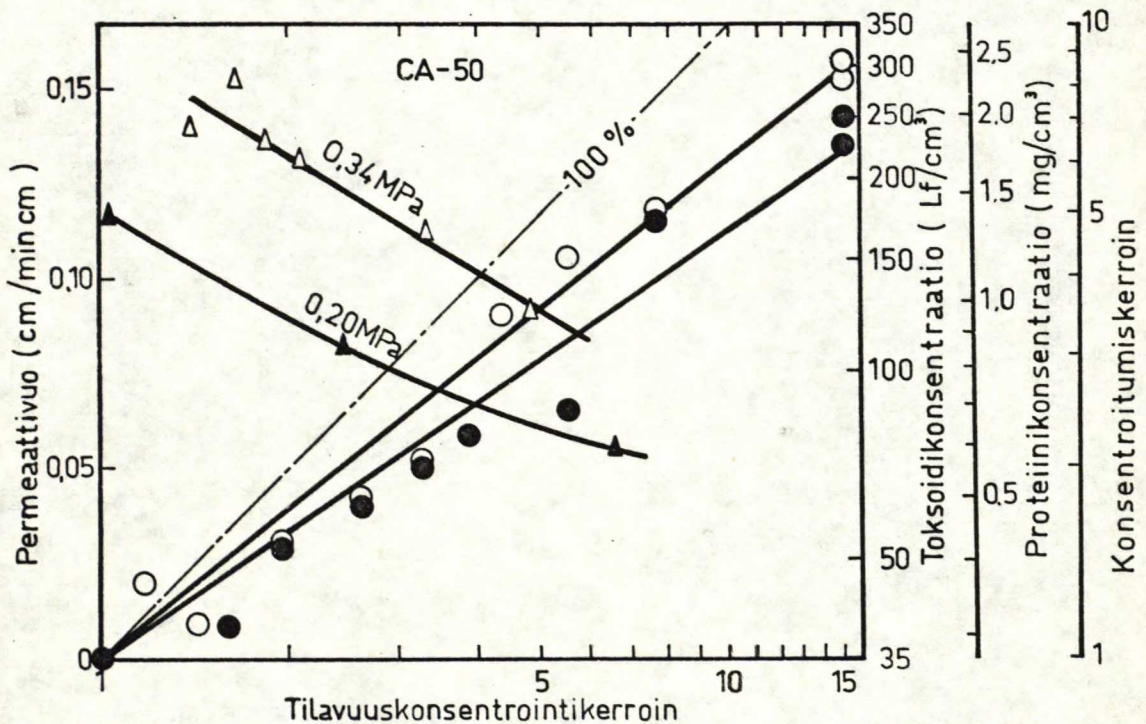
8.2. Konsentroitikokeet

8.2.1. Konsentroitinti selluloosa-asettaattikalvolla CA-50

CA-50-kalvolla konsentroititiin n. 81 toksoidierä käyttäen neljää rinnan liitettyä kalvoa, jolloin kokonaispinta-ala oli n. 470 cm^2 . Toksoidi konsentroititiin tilavuudeltaan 1/15-osaan. Alkuperäisen raakatoksoidin Lf-arvo oli 35

yks/ml, konsentraatin Lf-arvo oli n. 250 yks/ml, eli toksoidi oli konsentroitunut vain noin 7-kertaisesti. Vastaavasti todettiin proteiinipitoisuuden kasvaneen vain 8-kertaiseksi. Kuvassa 25 on esitetty permeaattivuo, Lf-arvo sekä proteiinipitoisuus tilavuuskonsentroitikertoimen funktiona.

Toksoidi- sekä proteiinikonsentraation vähäisestä noususta päätellen kalvo läpäisi toksoidia. Permeaatista ei kuitenkaan löytynyt Lf-määrittelyssä saostuvaa toksoidia. Toksoidi oli siis ilmeisesti denaturoitunut kalvon läpäis-



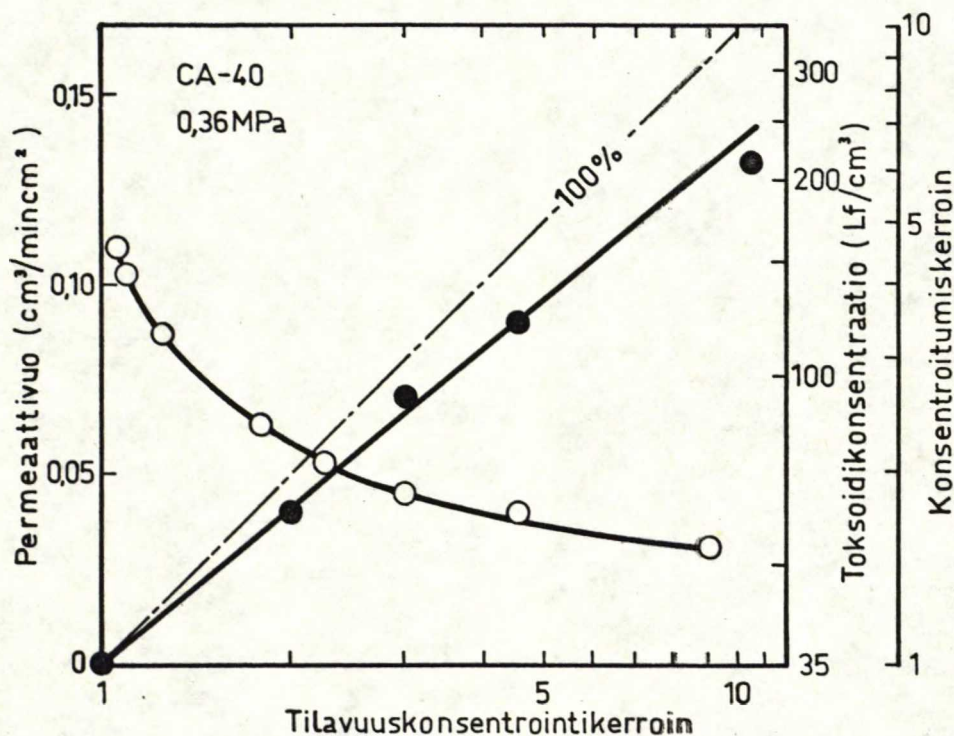
Kuva 25 Tetanustoksoidin konsentroidi CA-50-kalvolla

- Δ permeaattivuo 0,34 MPa paineella
- ▲ permeaattivuo 0,20 MPa paineella
- Lf-arvo
- proteiinikonsentraatio
- laskettu 100 % toksoidin pidähtyminen

tessään. Denaturoitunutta toksoidia oli myös konsentratissa Lf-arvon sekä proteiinin konsentroitumiskertoimen erosta päätellen. Kun lasketaan CA-50-kalvolla talteen saadun toksoidin määrä, saadaan Lf-arvojen perusteella noin 48 %.

8.2.2. Konsentointi selluloosa-asetaattikalvolla CA-40

Koska CA-35 oli paljon hitaampi kuin CA-50, kokeiltiin vielä niiden väliltä CA-40-kalvoa. Kuitenkin myös tällä kalvolla havaittiin osittaista toksoidin läpäisevyyttä. Kuvassa 26 on esitetty neljän kalvon keskimääräinen per-

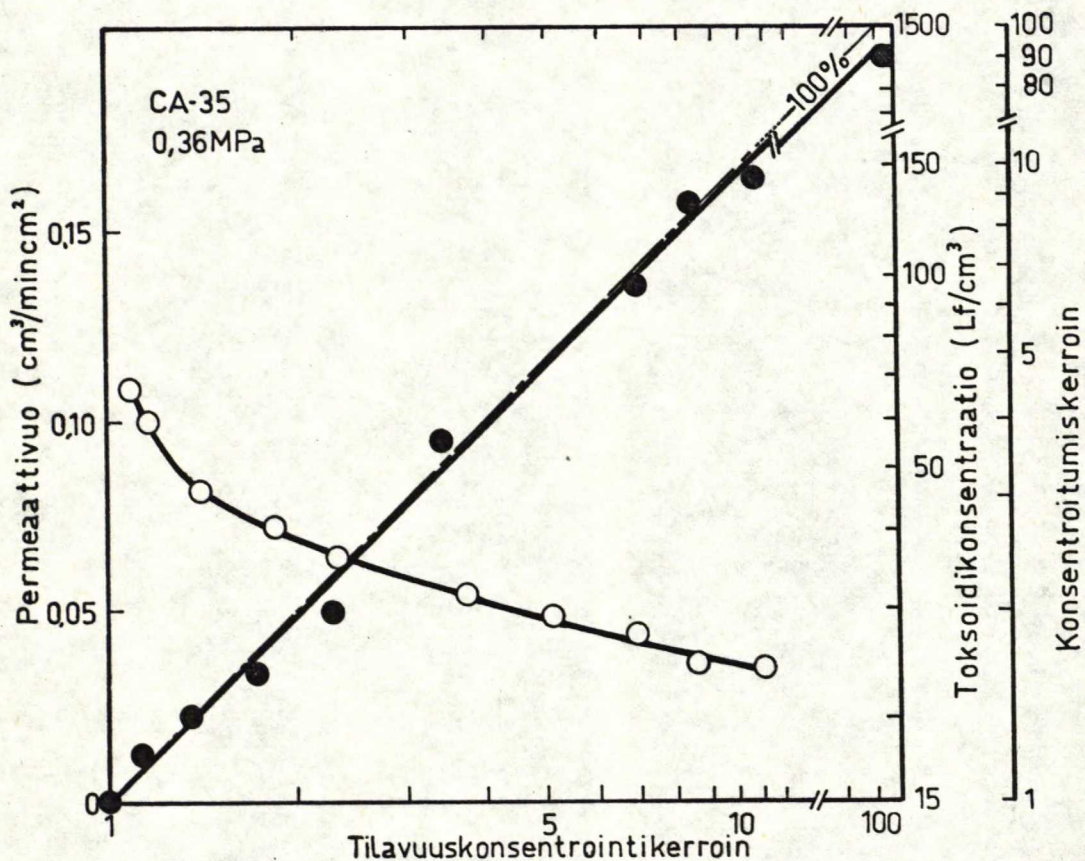


Kuva 26 Permeaattivuo (o) ja Lf-arvo (●) konsentroitumiskertoimen funktiona CA-40-kalvolla 0,36 MPa paineella; -.- laskettu 100 % toksoidin pidätytym.

meaattivuo konsentroitikertoimen funktiona. Toksoidin pidätyskyky oli CA-40-kalvoilla Lf-arvojen perusteella laskettuna noin 70 %.

8.2.3. Konsentointi selluloosa-asetaattikalvolla CA-35

Kuvassa 27 on esitetty konsentraatin ja permeaatin seoksen konsentointi CA-35-kalvolla. Lähtöliuoksella oli alhainen Lf-arvo (n. 15 Lf/ml). Paine oli 0,36 MPa ja toksoidin virtausnopeus kalvon pinnalla 2,7 m/s.



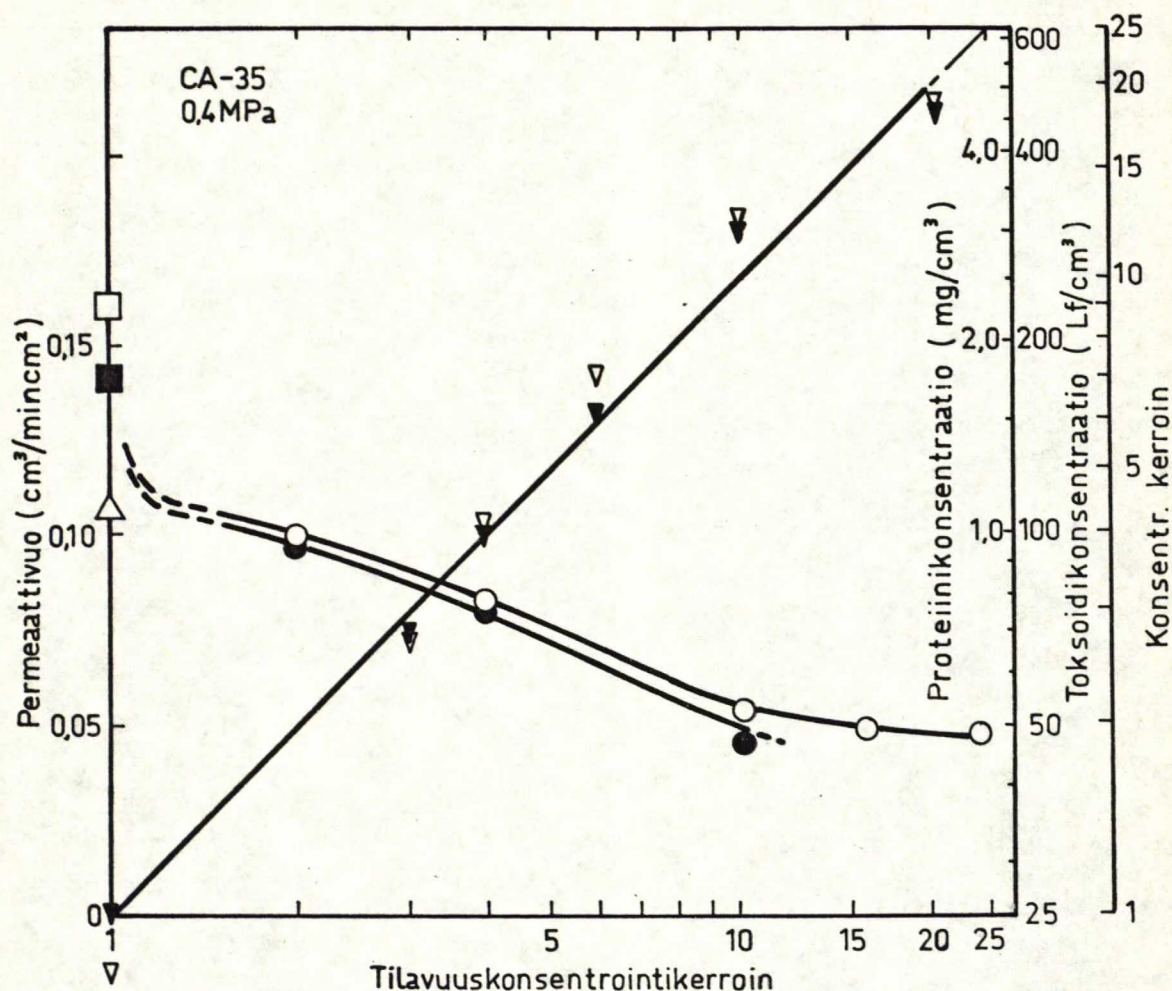
Kuva 27 Toksoidikonsentraatin ja permeaatin seoksen konsentointi CA-35-kalvolla. o permeaattivuo, • Lf-arvo, joka noudattaa laskettua 100% talteenottosuoraa (— · — ·)

Kalvo osoittautui permeaattivuoltaan yhtä hyväksi kuin CA-40. Se ei läpäissyt toksoidia: saanto oli käytännöllisesti katsoen 100 %. Konsentroitua jatkettiin vielä sekoituskennoilla noin 100-kertaiseen konsentraatioon asti.

9.3. Mittakaavan laajentaminen

Jotta koelaitetta voitaisiin paremmin verrata Kansanterveyslaboratorion käyttämään ultrasuodatuslaitteeseen (pinta-ala: 2100 cm^2), lisättiin sen kalvopinta-ala 1890 cm^2 :iin, jolloin laitteessa oli 16 kalvoa. Neljä kahden kalvon modulia oli varustettu syväuraisilla (urasyvyys $2,5 \text{ mm}$), aikaisemmissakin kokeissa, ja toiset neljä modulia olivat matalauraisia (urasyvyys $0,6 \text{ mm}$). Jälkimmäiset oli liitetty sarjaan edellisten kanssa (kuva 18). Rejektin paine mitattiin kolmesta pisteestä (p_1, p_2, p_3). Mitattiin myös kokonaisvirtausnopeus sekä kahden tai neljän kalvon yhdistetty virtausnopeus.

Ensimmäiseksi konsentroitui $28,21$ raakatoksoidia, jota pumpattiin jatkuvasti konsentraattisäiliöön konsentroidin edistyessä. Keskimääräinen paine oli $0,3 \text{ MPa}$. Liuos konsentroitui n. 25-kertaiseksi. Kuvassa 28 on esitetty permeaattivuon muuttuminen konsentraation kasvaessa.



Kuva 28 Raakatoksoidin konsentrointi CA-35-kalvolla
 ○ 28 l konsentrointi, kalvopinta-ala 1890 cm^2
 ● 17 l konsentrointi, kalvopinta-ala 945 cm^2
 □ Δ vesi-arvot ennen ja jälkeen I konsentroidinnin
 ■ vesi-arvo pesun jälkeen ▼ Lf-arvo
 ▽ proteiinikonsentraatio (mikro-Kjeldahl)

9.4. Kalvojen pesun vaikutus

Pesun vaikutusta kalvoihin tutkittiin antamalla pesuaineliuoksen vaikuttaa yli yön, minkä jälkeen kalvot huuhdeltiin vedellä, ja mitattiin veden virtausnopeus kalvon

läpi. Vesiärvot oli mitattu myös ennenkuin kalvoja oli käytetty konsentrointiin ja konsentroidin jälkeen. Tulos on esitetty kuvassa 28. Uudessa konsentroidinnissa käytettiin 8 kalvoa. Toksoidiliuosta oli 17 l. Se oli valmistettu sekoittamalla edellisen konsentroidinnin permeaattia ja konsentraattia, jolloin liuoksessa oli n. 20 Lf/ml. Seos konsentroiditiin n. 10-kertaiseksi, paine oli keskim. 0,4 MPa. Kuvassa 28 konsentroidinti on vertailun helpottamiseksi esitetty 0,3 MPa paineelle laskettuna. Kuvasta voidaan havaita, että pesu palauttaa kalvon lähes uuden veroiseksi. Huomataan myös, että permeaattivuota soittuu n. 10-kertaisessa konsentraatiossa pysyen lähes samana aina yli 20-kertaiseen konsentraatioon asti.

Konsentraatista määritettiin Lf, sekä typpi mikro-Kjeldahl-menetelmällä.

9. TULOSTEN TARKASTELU

Kansanterveyslaboratorion keskuslaboratoriossa raakatoksoidin konsentroidinnissa käytettävä ultrasuodatuslaite koostuu kuudesta huokoisesta aineesta valmistetusta bakteerisuodatuskynttilästä, joiden päälle on valettu kolloidiumkalvo. Kalvo valetaan kastamalla kynttilät liuokseen, jossa on vedettömässä jääetikassa 8 % selluloosaniitraattia. Tämän jälkeen kynttilät laitetaan veteen,

jolloin kalvo koaguloituu. Syntynyt kalvo on isotrooppinen sekä melko hauras. Se on siten herkkä painevaihteluille.

Tetanustoksoidin ultrasuodatuksessa käytetään noin 75 kPa paine-eroa, joka saadaan aikaan imulla. Permeaatin virtausnopeus on alussa noin $1 \text{ dm}^3/\text{h}$ tällä laitteella, jonka kokonaiskalvopinta-ala on n. $0,2 \text{ m}^2$. Permeaattivuoksi saadaan siten $8 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{min} \cdot \text{cm}^2$. Jos paine-eroa suurennetaan, kalvo rupeaa laskemaan toksoidia läpi. Kuvasta 22 arvioiden CA-35 permeaattivuo 75 kPa paineella on noin $10^{-2} \text{ cm}^3/\text{min} \cdot \text{cm}^2$ eli lähes sama kuin kollodiumkalvolaitteella. Selluloosa-asetaattikalvot kestävät kuitenkin painetta hyvin (10 MPa (34)), joten vuota voidaan suurentaa nostamalla painetta.

Raakatoksoidi konsentroidaan siis noin 15-kertaiseksi, ja konsentroidintinopeus on noin 100 l viikossa. Mikäli käytettäisiin CA-35 kalvoja konsentrintiin, voitaisiin permeaattivuota nostaa paineen avulla ainakin 5-kertaiseksi. Raakatoksoidin puhdistuksen yksikköoperaatioista on ultrasuodatus hitain. Suodatusnopeutta nostamalla voitaisiin 100 l kasvatuserä konsentroida yhden tai kahden työpäivän aikana, mikä pienentäisi toksoidin kontaminoitumismahdollisuutta. Vielä voitaisiin ajatella, että konsentrinti suoritettaisiin heti, kun solut on poistettu kasvuliuoksesta (liite 1). Toksoidituotannon aikana kasvatetaan useita eriä perättäisinä viikkoina, ja

ne ovat toksoidisoitumisvaiheen aikana samanaikaisesti 35°C huoneessa 10 l pulloissa. Jos liuos olisi konsentroidu pieneen tilavuuteen, säästyisi paljon tätä termostoitua varastotilaa.

CA-35-kalvoilla suoritettussa 28 l toksoidierän konsentroinnissa oli kalvopinta-ala n. $0,2 \text{ m}^2$, siis sama kuin kollodiumkalvolaitteessa. Permeaattivuo laski kokeen aikana noin puoleen tasoittuen n. 10-kertaisessa konsentraatiossa arvoon $0,05 \text{ cm}^3/\text{min} \cdot \text{cm}^2$ ja pysyen tässä n. 25-kertaiseen konsentraatioon asti. Mikäli oletetaan kalvojen läpäisykyvyn säilyvän samanlaisena, voitaisiin 100 l toksoidierä konsentroida n. 17 h aikana, kun paine on $0,4 \text{ MPa}$. Jos toksoidi haluttaisiin konsentroida yhden työpäivän aikana, olisi kalvopintaa oltava noin $0,5 \text{ m}^2$ käytettäessä $0,3 \dots 0,4 \text{ MPa}$ painetta, joka diplomityössä havaittiin sopivaksi.

Toksoidimolekyylin rakenteen säilyminen puhdistusprosessin aikana on olennaisen tärkeää toksoidin suojausvaikutukselle tetanusta vastaan. Voimakkaat fysikaaliset käsittelyt voivat helposti denaturoida toksoidiproteiinin. Ultrasuodatuksessa tällaista voi aiheutua liian suurista virtausnopeuksista ohuissa putkissa, jolloin syntyy suuria leikkausvoimia. Samoin kierrätyspumppu voi denaturoida proteiineja. Ultrasuodatuksen aikana konsentraatti myös lämpenee voimakkaasti, joten riittävään jäähdytykseen on kiinnitettävä huomiota. Toisaalta lämpötilan

noustessa permeaattivuokasvaa. Siksi on valittava sopiva lämpötila, joka ei ole vaaraksi proteiinille eikä kalvolle, mutta parantaa permeaattivuota, ja pidettävä se yllä termostaatin avulla.

Diplomityössä käytettyjen ultrasuodatusmodulien virtausohjaimen kanavat olivat riittävän väljänsyväuraisissa virtausohjaimissa: mitään denaturoitumista ei havaittu, kun käytettiin proteiinit täysin pidättävää CA-35-kalvoa. Walliander (17) käytti lisensiaattityössään sekä syvä- että matalauraisia virtausohjaimia (uran leveys 5 mm ja syvyys 2,5 mm sekä 0,6 mm). Matalauraisilla hän havaitsi entsyymien denaturoitumista, syväuraisilla tätä ei esiintynyt. Tässä diplomityössä laajennetun mittakaavan konsentrintikokeilussa käytettiin 8 virtausohjainta, joiden molemmilla puolilla oli kalvo (kuva 14). Neljä näistä oli matalauraisia ja ne oli liitetty sarjaan syväuraisten perään painehäviöiden tasaamiseksi. Lf-arvoissa havaittiin pientä laskua, jonka voidaan olettaa johtuneen matalauraisten modulien aiheuttamasta toksoidin denaturoitumisesta. Matalauraisissa moduleissa virtaus on lisäksi laminaarista, mikä aiheuttaa suuren konsentraatiopolarisaatiokerroksen ja pienemmän permeaattivuon. Myös tässä kokeessa matalauraisilla moduleilla oli pienemmät permeaattivuot kuin syväuraisilla.

Toinen pulma, joka koskee erityisesti laitteen rakennetta, on aseptisuuden aikaansaaminen. Diplomityössä käytetty

laite oli monimutkainen ja täynnä taskuja, joita ei voitu tehokkaasti desinfioida formaliinikäsittelyllä. Tämä pulma on helposti poistettu käyttämällä kuhunkin ongelma-kohtaan (venttiileihin, liitoksiin, mittauspisteisiin jne) tarkoitukseen sopivaksi tehtyä osaa. (Diplomityössä käytettiin helpoimmin saatavia osia, koska aseptiikkaongelmien ratkaisu käytännössä olisi vienyt aikaa liian paljon.)

Työssä käytettyjen ultrasuodatusmodulien tiivistäminen tuotti vaikeuksia, jos niitä oli enemmän kuin kolme päällekkäin. Tetanustoksoidin konsentroinnissa ei vuotoa saisi esiintyä lainkaan konsentraatin puolelta aerosolien muodostumisvaaran tähden. Vastaavasti, kun kone pysäytetään, laskee paine konsentraatin puolella, ja toksoidiin saattaa päästä mikrobeja ulkopuolelta. Mikäli halutaan suurat kalvopinta-alaa, on ultrasuodatusmodulipakkoja koottava useita, mikä aiheuttaa paljon työtä koottaessa ja purettaessa. Ongelman ratkaisuna voisi olla jokin kaupallinen vastaavanlainen 'plate-and-frame'-tyyppinen laitteisto, johon voisi käyttää omatekoisia kalvoja ja jossa olisi riittävän suuri virtausura turbulentin virtauksen aikaansaamiseksi. Toinen vaihtoehto olisi jokin kaupallinen kalvo, jolla on riittävän pitkä ikä, ts. joka kestää hyvin erilaisia puhdistusmenetelmiä sekä on huokoskooltaan sopiva, niin ettei se tukkeudu helposti. Putkityyppinen laite lienee tällöin huollon kannalta sopivin.

YHTEENVETO

Työssä kokeiltiin erilaisten omatekoisten selluloosa-asettaattikalvojen soveltuvuutta tetanusraakatoksoidin konsentroidintiin. Kokeilluista kalvoista osoittautui sopivaksi CA-35. Suurempihuokoiset kalvot läpäisivät toksoidia ja myös tukkeutuivat nopeammin. Tukkeutumista voidaan tehokkaasti hidastaa sekoittamalla konsentraattia voimakkaasti kalvon pinnalla. Näin tapahtuu, kun konsentraatti virtaa riittävän suurella nopeudella kyllin väljässä urassa kalvon pintaa pitkin. Myös suuri laminaarivirtausnopeus pienentää kalvon tukkeutumisenopeutta, mutta tällöin esiintyvät suuret leikkausvoimat saattavat denaturoida toksoidia. Työssä käytetty turbulenti lineaarivirtausnopeus oli suurimmillaan n. 2,7 m/s, mikä ei aiheuttanut havaittavaa denaturoitumista.

Toksoidin lämmönkestävyyttä ei kokeiltu. Konsentroidintilämpötilat vaihtelivat 30...35°C, minkä toksoidi kesti hyvin mekaaniseen rasitukseen yhdistettynä.

Laitteen, jolla toksoidia konsentroidaan, tulee olla steriloitavissa joko kemiallisesti tai lämmön avulla, sekä myös helposti purettava puhdistuksen ja kalvojen vaihdon yksinkertaistamiseksi. Koska pakkosyöttöpumpulla toimivaa laitetta ei voi jättää ilman valvontaa, on kalvopinta-ala tehtävä niin suureksi, että panos voidaan konsentroida yhden työpäivän aikana.

KIRJALLISUUS

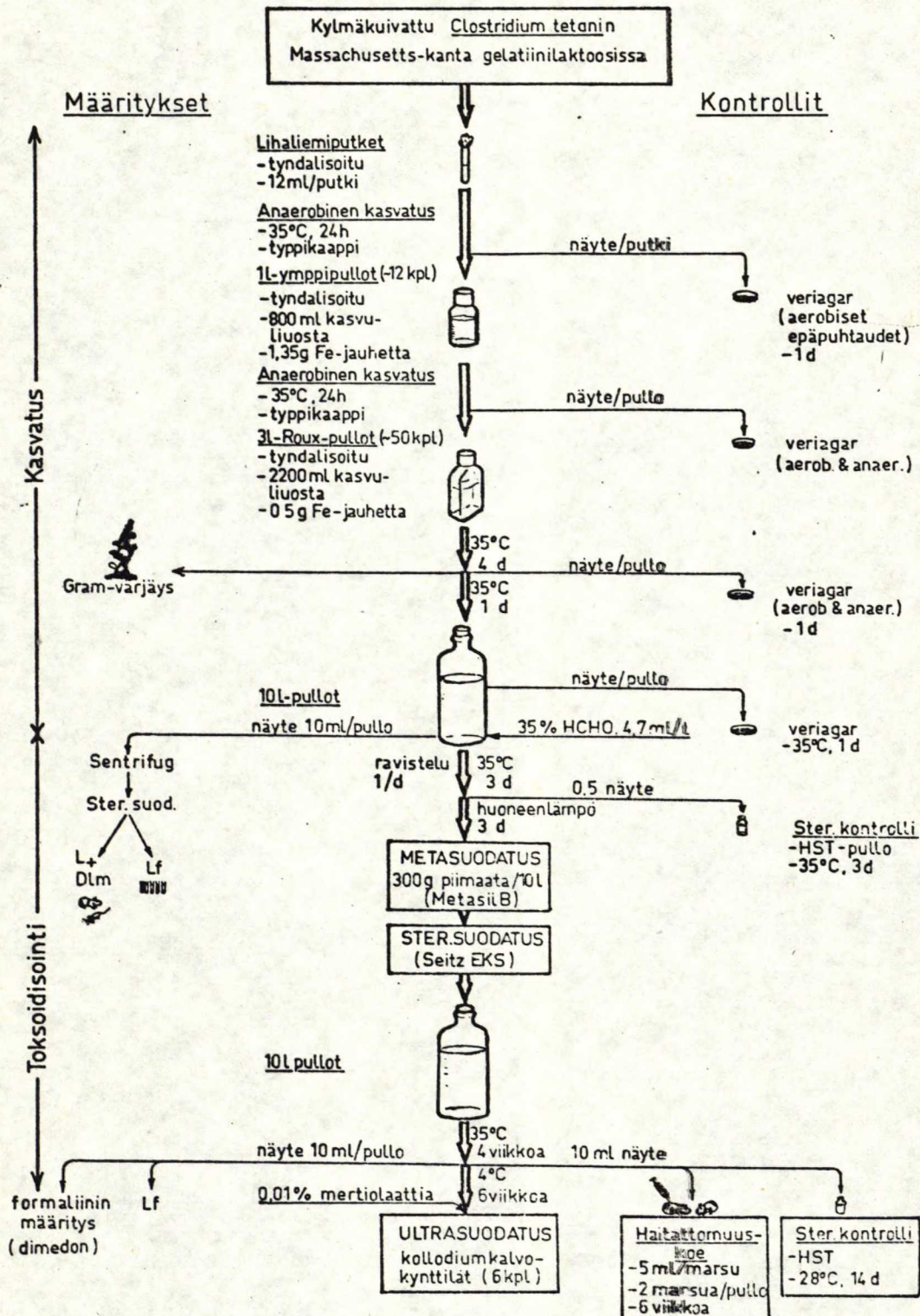
1. Malmgren, B., Introduktion till Mikrobiologin, Natur och Kultur, Stockholm 1968, s. 212.
2. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B., Microbiology, New York 1968, s. 474.
3. Mäkelä, O., Mäkelä, P.H., Wager, O., Vaheri, A., Eds., Lääketieteellinen mikrobiologia, Suomalainen lääkäriseura Duodecim, Vammala 1975.
4. Lääkintöhallituksen suositus rokotusohjelmaksi v. 1975
5. Jännes, L., Suomen Kemistilehti A31(1958)175.
6. Van Heyningen, W.E., Mellanby, J. in Kadis, S., Montie, T.C., Ajl, S.S., Eds., Microbial Toxins, Academic Press, New York 1971, Vol. IIa.
7. Van Heyningen, W.E. in Kadis, S., Montie, T.C., Eds., Microbial Toxins, Academic Press, New York 1970, Vol. I, s. 6.
8. Batty, I. in Norris, J.R., Ribbons, D.W., Eds., Methods in Microbiology, Academic Press, London 1971, Vol. 5a, s. 255.
9. Pharmacopoea Nordica, Editio Fennica, Lääkintöhallitus, Helsinki 1961, Vol. IV, s. 30.3.
10. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 293(1964)41
11. Raynaud, M., Ann. Inst. Pasteur 80(1951)356.
12. Aghdachi, M., Sadegh, A., Mirchamsy, H., Ann. Inst. Pasteur 98(1960)316.

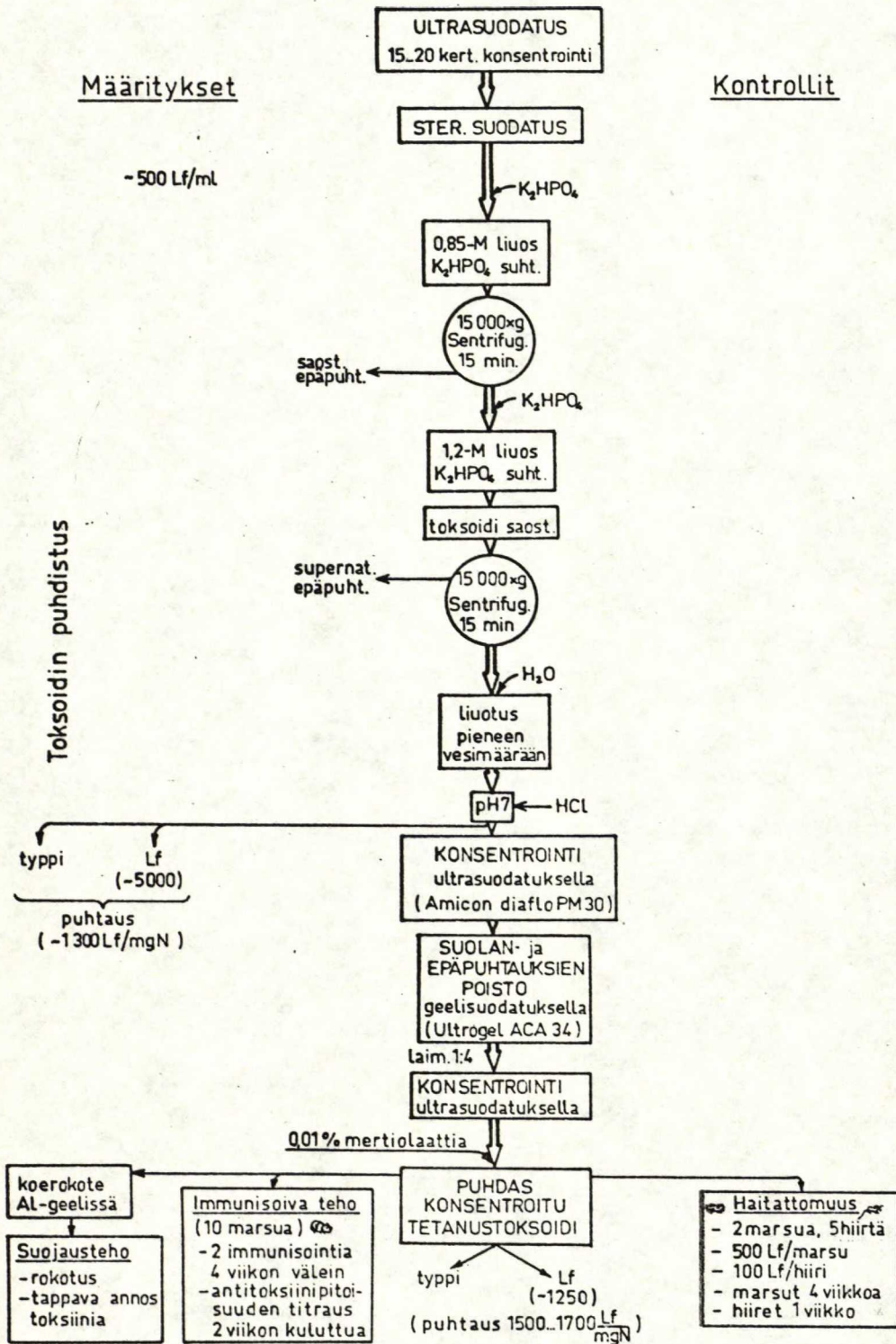
13. Mueller, J.H., Miller, P.A., J. Bacteriol. 67(1954)271.
14. Konstantinov, G., Ognyanova, M. in Rangelova, S.M.,
Scientific Works of the Research Institute of
Epidemiology and Microbiology, Bulgaria, Vol. XII, s. 77.
15. Kansanterveyslaboratorion toimintakertomus v. 1974,
Helsinki 1975.
16. Törnblom, N-E., Orion Oy, suullinen tiedonanto, 1976.
17. Walliander, P., Lisensiaattityö, TKK, Otaniemi 1974.
18. Lacey, R.E., Chem. Eng. 79(1972)19,56.
19. Loeb, S., Sourirajan, S., Advan. Chem. Ser. 38(1962)117.
20. Porter, M.C., Michaels, A.S., Third International Congress
of Food Science and Technology, August 9-14, 1970, New
York.
21. Kreula, M., Heikonen, M., Nordhud, J., Karjantuote 54(1971)264.
22. Millipore Catalogue MC/1, Millipore Corporation, Bedford
1971, 1D030.
23. Frommer, M.A., Lancet, D. in Lonsdale, H.K., Podall, H.E.,
Eds., Reverse Osmosis Membrane Research, Plenum Press,
New York 1972, s. 85.
24. Van Oss, C.J., McConnell, C.R., Tompkins, R.K., Bronson, P.M.,
Clin. Chem. 15(1969)699.
25. Van Oss, C.J., Bronson, P.M. in Flinn, J., Ed., Membrane
Science and Technology, Plenum Press, New York 1970, s. 139.
26. McDonough, J. Milk and Food Technol. 35(1972)102.

27. Blatt, E.F., Dravid, A., Michaels, A.S., Nelsen, L. in Flinn, J., Ed., Membrane Science and Technology, Plenum Press, New York 1970, s. 47.
28. Fenton-May, R.I., Hill, C.G., Amundson, C.H., Lopez, M.H., Auclair, P.D., J. Dairy Sci. 55(1972)1561.
29. Walliander, P., SITRA, Sarja A, No 15, 1973, IV.
30. Walliander, P., Linko, M., Linko, Y-Y., Kemia-Kemi 2(1975)373.
31. Kesting, R.E., Synthetic Polymeric Membranes, McGraw Hill Book Company, New York 1971, s. 163.
32. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193(1951)265.
33. Biokemian harjoitustyöt cum laude-oppimäärää varten, Helsingin Yliopiston biokemian laitos, Helsinki 1965.
34. King, W.M., Hoernschemeyer, D.L., Saltonstall, C.W. in Lonsdale, H.K., Podall, M.E., Eds., Reverse Osmosis Membrane Research, Plenum Press, New York 1972, s. 131.

Jäykkäkouristusrokotteen valmistus I

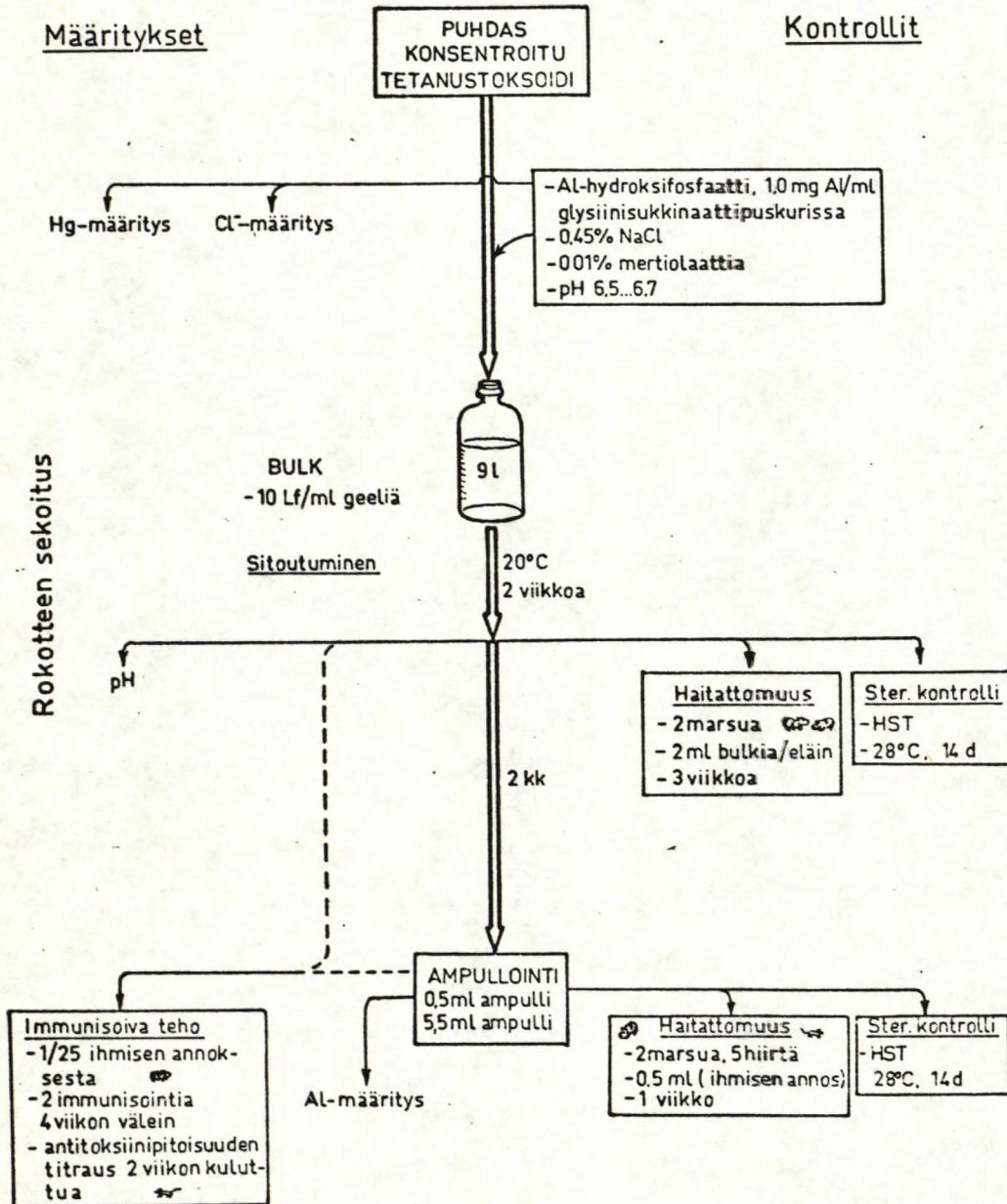
- toksiinin tuotanto ja toksoidisointi



Jäykkäkoristusrokotteen valmistus II- toksoidin puhdistus

Jäykkäkouristusrokotteen valmistus III

- rokotteen sekoitus standardisointi ja pakkaus



A Lihaliemiputkien kasvuliuos

Vasikanlihauutetta	1 000 ml (1 kg vasikanlihaa + 1000 ml H ₂ O)
NaCl	3 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2 g
Proteose pepton (Difco)	10 g

Seosta keitetään 20 min ja pH tarkistetaan (oltava 7,2).

1 % glukoosia lisätään 10 % vesiliuoksena

12ml lihalientä pipetoidaan koeputkiin, jotka suljetaan

pumpulitupolla. Putket steriloidaan tyndallisoimalla

(15 min 100°C kolmena perättäisenä päivänä). Ennen ymp-

päystä putkia pidetään kiehuvaassa vesihauteessa 10 min ja

jäähdytetään nopeasti.

B Haimalla hydrolysoitu kaseiini (12)

Kaseiinia	15 kg
Na ₂ CO ₃	555 g
Haimaliuosta	7 500 ml

valmistus: 2 kg jauhettua vasikan haimaa

6 l H₂O

1 500 ml C₂H₅OH

-valmistetaan muutama päivä ennen käyttöä

Kloroformia 750 ml

H₂O 150 l

Na_2CO_3 liuotetaan 10 l H_2O lämmittämällä 60°C .

200 l sekoittajalla varustettuun hydrolyysipulloon mitataan 140 l vettä ja Na_2CO_3 -liuos lisätään. Kaseiini lisätään sekoittaes ja sen jälkeen vasikanhaimavalmiste. Lopuksi lisätään sopiva määrä kloroformia. Seoksen pH säädetään 7,4...7,5. Hydrolyysi suoritetaan 37°C 12 vuorokautta. Seosta sekoitetaan mekaanisesti joka päivä ja samalla tarkistetaan pH. 16 vuorokauden kuluttua seosta keitetään 1 h, kloroformia lisätään ja seos pullotetaan sekä säilytetään jääkaapissa kunnes tarvitaan.

Ennen käyttöä kirkas supernatantti juoksutetaan pois, kuumennetaan 90°C , pH säädetään 6,0 kons. HCl :lla, 20 g puuhiiltä lisätään litraa kohti, seosta sekoitetaan 30 min ja suodatetaan Büchner-suppilolla käyttäen suodatusapuaainetta. Amino- sekä kokonaistyyppi määritetään ja lopulliseen kasvuliuokseen lisätään niin paljon haimalla hydrolysoitua kaseiinia, että aminotyyppi on 1,17 mg/ml. (Tavallisesti 250...300 ml 750...700 ml kasvuliuosta kohti.)

C Sydänuute

1 kg vasikan sydäntä jauhetaan ja 1 l H_2O lisätään. Seosta keitetään 30 min ja suodatetaan. Sterilointi tapahtuu 1 l pulloissa 30 min 120°C .

Kasvuliuoksen valmistus

Haimalla hydrolysoitua kaseiinia niin paljon, että lopullinen aminotyyppikonsentraatio on 1,17 mg/ml (Liite 4:B):

	n. 3000 ml	
Sydänuutetta (Liite 4:C)	500 ml	
Glukoosia	110 g	
Na_2HPO_4	12 g	
NaCl	25 g	
KH_2PO_4	1,5 g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g	
l-kysteiiniä*	1,5 g	} muutamassa ml HCl
l-tyrosiiniä	5 g	
Ca-pantotenaattia	10 mg	
Uraasiilia	25 mg	
Tiamiinia	2,5 mg	
Riboflaviinia	2,5 mg	
Pyridoksiinia	2,5 mg	
Biotiinia	25	
H_2O	ad 10 l	

*Kysteiinin merkitys epävarma, koska se luultavasti tuhoutuu autoklavoitaessa.

Kasvuliuos pullotetaan 2,8 l Roux-pulloihin. Kuhunkin pulloon tulee 2200 ml liuosta sekä lisäksi 0,5 g rautajauhetta. Pullot suljetaan pumpulitukolla, jotka peitetään alumiinihylsillä. Pullot steriloidaan kahtena perättäisenä päivänä 30 min 100°C (tyndallisointi).

